

サイレージ発酵における硝酸塩の役割と その意義に関する研究

安 宅 一 夫*

The Role of Nitrate in Silage Fermentation and Its Significance

Kazuo ATAKU*

(May 1982)

目 次

緒 論	212
第1章 サイレージの品質に及ぼす窒素施肥の影響	214
第1節 窒素施肥量の増加に伴う品質低下とその解析	214
1. 緒 言	214
2. 材 料 と 方 法	215
3. 結 果 と 考 察	216
4. 要 約	218
第2節 高窒素施肥による品質改善と材料成分	218
1. 緒 言	218
2. 材 料 と 方 法	218
3. 結 果	219
4. 考 察	222
5. 要 約	223
第3節 窒素施肥の影響の多面性と材料牧草の硝酸塩含量	224
1. 緒 言	224
2. 材 料 と 方 法	224
3. 結 果	225
4. 考 察	227
5. 要 約	229
第2章 サイレージ発酵に及ぼす硝酸塩の影響	230
第1節 材料牧草の化学成分, 特に硝酸塩含量とサイレージ品質	230
1. 緒 言	230
2. 材 料 と 方 法	230
3. 結 果	230

* 酪農学科, 家畜栄養学研究室

Laboratory of Animal Nutrition, The College of Dairying, Ebetsu, Hokkaido, Japan.

4. 考 察	236
5. 要 約	240
第2節 硝酸塩添加の効果	240
1. 緒 言	240
2. 材 料 と 方 法	241
3. 結 果	242
4. 考 察	246
5. 要 約	248
第3節 硝酸塩添加とグルコース添加の相互効果	249
1. 緒 言	249
2. 材 料 と 方 法	249
3. 結 果	250
4. 考 察	252
5. 要 約	254
第4節 硝酸塩添加, グルコース添加並びに温度の相互効果	254
1. 緒 言	254
2. 材 料 と 方 法	254
3. 結 果	255
4. 考 察	257
5. 要 約	258
第5節 硝酸塩添加, グルコース添加並びに温度と乳酸異性体分布	258
1. 緒 言	258
2. 材 料 と 方 法	258
3. 結 果	259
4. 考 察	260
5. 要 約	261
第6節 硝酸塩含量と発酵経過, 特に 2, 3-ブタンジオール の生成並びに硝酸塩の消長	261
1. 緒 言	261
2. 材 料 と 方 法	262
3. 結 果	262
4. 考 察	264
5. 要 約	266
第3章 サイレージ発酵における硝酸塩の還元	266
第1節 イオン電極法による牧草中の硝酸塩の定量	266
1. 緒 言	266
2. 材 料 と 方 法	267
3. 結 果 と 考 察	267
4. 要 約	272
第2節 サイレージ及び乾草調製における硝酸塩含量の変化	272
1. 緒 言	272

2. 材料と方法	272
3. 結 果	272
4. 考 察	274
5. 要 約	275
第3節 材料牧草の化学成分並びにサイレージ品質と硝酸塩消失量 の変化との関係	276
1. 緒 言	276
2. 材料と方法	276
3. 結 果	276
4. 考 察	277
5. 要 約	278
第4節 サイレージ品質と硝酸塩含量に及ぼす密封時期, 温度並びに水分含量の影響	279
1. 緒 言	279
2. 材料と方法	279
3. 結 果	281
4. 考 察	281
5. 要 約	282
第5節 微生物の動態と硝酸塩の消長	283
1. 緒 言	283
2. 材料と方法	283
3. 結 果	283
4. 考 察	285
5. 要 約	286
第6節 サイレージ品質と ¹⁵ N-硝酸塩の還元	286
1. 緒 言	286
2. 材料と方法	287
3. 結 果	287
4. 考 察	288
5. 要 約	290
第7節 材料の硝酸塩含量とサイレージ品質並びに ¹⁵ N-硝酸塩の還元	291
1. 緒 言	291
2. 材料と方法	291
3. 結 果	291
4. 考 察	293
5. 要 約	294
第4章 サイレージの飼料価値に及ぼす硝酸塩の影響	295
第1節 材料牧草の硝酸塩が消化率並びに第一胃内性状に及ぼす影響	295
1. 緒 言	295
2. 材料と方法	295
3. 結 果	296

4. 考 察	297
5. 要 約	299
第2節 硝酸塩添加が消化率、窒素・ミネラル出納並びに 臨床生化学的所見に及ぼす影響	299
1. 緒 言	299
2. 材 料 と 方 法	299
3. 結 果	300
4. 考 察	305
5. 要 約	306
総 括	306
謝 辞	311
文 献	311
Summary	315

緒 論

反芻動物は、人間や単胃の動物が直接利用不可能な草を有効に利用して、人間が生きていく上での原動力となる乳、肉等の如き優れた食品を生産することができる。一方、反芻動物は他の動物が利用できない草だけでも飼育できるという利点を有する反面、健康を維持するために一定量の繊維質（草）を摂取しなければならないという栄養特性を有している。従って、草一家畜一人間につながる一連の関係の中で草は重要な意義を有している。

牧草は、生育に必要な窒素源として、土壤水中に含まれる硝酸塩を根から吸収する¹²⁸⁾。吸収された硝酸塩は、植物体内の酵素作用によりアンモニアに還元され、それはやがて、クレブスサイクル系の有機酸と結合し、アミノ酸、核酸等が合成される²⁴⁾。これらはさらに高分子化して、植物体が構成される¹¹⁶⁾。しかし、植物体内における硝酸塩の吸収と同化のバランスが何らかの理由によって乱されると、植物体内にときとして多量の硝酸塩が蓄積することがある²⁴⁾。

Wright and Davison¹³⁴⁾によれば、牧草の硝酸塩蓄積に影響する要因は、外的なものと内的なものに大別される。外的要因としては、養分（施肥）、土壤水分、光、除草剤、刈取りその他の環境要因があり、内的要因としては、草種、器官、成熟度、酵素等が知られているが、中でも施肥、特に窒素施肥の影響は著しい。

一方、硝酸塩含量の高い牧草を採食した家畜、殊に反芻動物は、しばしば食欲減退、体重減少、下痢、流産、乳量低下及び尿量増加等の症状を呈し、甚しい場合には死に至ることが知られている^{75,134)}。この現象は一般に家畜の硝酸中毒と呼ばれ、その発生機序は次の

如く説明されている。反芻動物が硝酸塩を摂取すると、反芻胃内で硝酸塩は亜硝酸塩、ヒドロキシルアミン等を経て、アンモニアへと還元される²¹⁾。このとき、中間還元産物である亜硝酸塩がそのまま血液中へ吸収されると、ヘモグロビンの鉄イオンが2価から3価へと変わり、メトヘモグロビンができる¹⁰²⁾。メトヘモグロビンは体内の酸素分圧の低いところにおいても酸素を放出しないため⁵⁹⁾、血液中にメトヘモグロビンが多くできると、動物の組織は徐々に酸素不足となり、重症の場合、死亡する⁴¹⁾。

反芻動物に対する硝酸塩の害作用は、血液中のメトヘモグロビン形成と密接な関係があると考えられる。宮崎⁷³⁾は、硝酸塩摂取による反芻動物の血液中のメトヘモグロビン形成に及ぼす諸要因について、栄養生理学的に検討し、硝酸塩の投与量並びに投与方法、メトヘモグロビン形成における個体差、飼料の種類並びに給与水準等の影響を明らかにしている。

反芻家畜に対する硝酸塩の中毒量について、Bradley ら^{73,75)}は、牛では体重1 kg 当り硝酸カリウムとして0.55 g を摂取すれば致死量となり、風乾物当り硝酸態窒素($\text{NO}_3\text{-N}$)として0.2%以上含む牧草を採食すると中毒死すると報告している。また、Holtenius⁴⁰⁾の総説によれば、牛や羊に対する硝酸カリウムの経口投与による致死量は、飼養条件によって異なるが、体重1 kg 当り0.6~1.0 g であると考えられている。

わが国における牧草及び飼料作物の硝酸塩含量の実態を調査した報告は枚挙にいとまがないが、宮崎の総説⁷⁵⁾によると、硝酸塩含量は、近年次第に多くなりつつあり、中でも、多肥条件下で生産されたイタリアンライグラス、トウモロコシ、エンバク、アオビユ、イヌビユ等には、前述の中毒量の数倍の硝酸塩が検出されている。また、そのような牧草や青刈飼料作物の摂取によって牛が硝酸中毒を起こした例も多く報告されている。

一方、サイレージ調製によって、硝酸塩含量が減少することが知られている^{60,61,62,72,84,85,121,122)}。しかし、サイレージ発酵過程で硝酸塩含量が減少する機序並びに硝酸塩がサイレージ発酵に及ぼす影響についてはほとんど知られていない。

本研究は、わが国における牧草栽培が狭隘な草地と多頭数飼養との関連から、窒素肥料の多用による高位生産を目標として発展し、硝酸塩含量の高い牧草が生産されやすいことに着目し、サイレージ発酵における硝酸塩の役割並びにその意義を検討したものである。まず、第1章では、サイレージの品質に及ぼす窒素施肥の影響を材料牧草の硝酸塩含量との関連で検討し、窒素施肥の影響は多面的であるが、窒素施肥によって材料の硝酸塩含量が高くなる場合には、良質サイレージが得られたことから、硝酸塩がサイレージ発酵を改善することを示唆した。次いで、第2章では、硝酸塩添加が、サイレージ発酵に及ぼす影響をこれまで知られている種々の要因との関連で詳細に検討し、材料の硝酸塩含量が高くなると、サイレージ発酵における酪酸、2,3-ブタンジオール及びアンモニア生成が強く

抑制されることを認めた。第3章では、サイレージの発酵過程における硝酸塩の消長とサイレージ品質との関係を詳細に検討し、これらの間には密接な関係があることを明らかにするとともに、 ^{15}N で標識した硝酸塩を用いて、サイレージの発酵過程における硝酸塩の還元経路を明らかにした。さらに第4章では、サイレージの飼料価値に及ぼす硝酸塩の影響を栄養生理学的に検討し、硝酸塩はサイレージの消化率、窒素、カルシウム並びにリン出納及び第一胃内発酵を改善することを明らかにした。

前述の如く、近年わが国において牧草栽培の集約化に伴い、硝酸塩含量の高い牧草が生産され、家畜の硝酸中毒が大きな問題となってきた。従って、家畜にとって安全な牧草の栽培並びにその利用法の確立は焦眉の急と考えられる。これらのことから、本研究において硝酸塩がサイレージの発酵並びに飼料価値を改善すること、及びサイレージ発酵過程で硝酸塩が消失する機序を明らかにしたことは、サイレージ発酵の基礎的見地から重要であるばかりでなく、草地利用あるいは家畜飼養の実際面においても重要な意義を有すると考える。

なお、本論文において、サイレージの品質という表現をしばしば用いるが、これは次の如く定義する。即ち、サイレージの品質は、発酵の良否、いわゆる発酵品質（狭義の品質）と、サイレージの飼料価値（広義の品質）によって判定する二つの場合があるが¹¹⁾、本論文におけるサイレージの品質は発酵品質を意味し、Flieg による評価に基づいて^{92,106)}、生成された有機酸のうち、乳酸の割合の高いものを良質とし、酪酸及びこれ以上の揮発性脂肪酸 (VFA) の割合の高いものを品質が劣るとし、さらに、pH 並びに全窒素に対するアンモニア態窒素割合の低いものを良質とした。

第1章 サイレージの品質に及ぼす窒素施肥の影響

第1節 窒素施肥量の増加に伴う品質低下とその解析

1. 緒 言

サイレージ発酵において、WSC の重要性はすでに広く認められており、材料に WSC 含量が高ければ良質のサイレージができること^{66,94,103)}、また、グルコースその他の糖の添加によってサイレージの品質が著しく改善されることが報告されている^{87,93,127)}。

一方、従来粗蛋白質含量の高い材料を用いてサイレージを調製すると、酪酸発酵の支配的な劣質サイレージができやすいとされている⁶⁴⁾。

牧草の WSC 及び粗蛋白質含量は、窒素施肥の影響を強くうけ、窒素施肥量が増加すると、粗蛋白質含量が高くなり、WSC 含量が低下することが知られている^{20,32,44,45,46,47,49,}

107,108)。

従って、サイレージの品質に及ぼす窒素施肥の影響については、すでに多くの報告がなされているが^{30,32,42,46,48,68,69,82)}、その結果は一様でない。

一方、窒素肥料の多施用によって、牧草の硝酸塩含量が高くなることが知られているが、サイレージ発酵に及ぼす硝酸塩の影響は知られていない。

よって、本章では、サイレージの品質に及ぼす窒素施肥の影響を材料牧草の成分との関連で詳細に検討するため一連の実験を行った。

本節では、窒素施肥を4段階で行ったチモシー主体の牧草を用いてサイレージを調製し、窒素施肥量とサイレージ品質との関係を直交多項式によって解析した⁷⁾。

2. 材料と方法

供試圃場には、酪農学園大学中央農場のチモシー優占草地(5年次)を用い、以下の窒素施肥量により4区(1区画500 m², 20 m×25 m)を設けた。

窒素施肥量は、硫安を用い10アール当り、0, 5, 10及び15 kg Nの4段階とし、りん酸(過りん酸石灰)8 kg, 加里(硫酸加里)12 kgは全区に同量施用した。

牧草は、Table 1に示すように1971年6月30日から7月2日の間にチモシーの出穂揃期に刈取り、直ちにカッターで約3 cmに切断し、200 kg容バッグサイロに4反復して埋藏した。

Table 1. Outline of the forages ensiled

N applied (kg/10 a)	Date of cut.	Growth stage	Leaf weight ratio (%)	Height of plant (cm)	Dry matter yield (kg/10 a)
0	July 1, 1971	Full heading	30	93	501
5	July 2, "	"	24	108	910
10	" "	"	22	105	1037
15	June 30, "	"	30	109	866

牧草は、95~100°Cの通風乾燥機内で1時間乾燥してから65°Cで十分に乾燥した後粉碎して分析に供した。一般成分の分析は常法⁷⁶⁾、硝酸塩はイオン電極法¹²⁾によりそれぞれ定量した。

サイレージは、新鮮物の水抽出を行い、抽出液を用いて、pHはガラス電極 pHメーターにより測定し、有機酸はフリース法^{76,106)}、アンモニア態窒素(NH₃-N)は水蒸気蒸留法⁷⁶⁾によりそれぞれ定量した。

サイレージの発酵成分のデーターは分散分析を行い、直交多項式を用いて統計学的に解析した¹³⁵⁾。

3. 結果と考察

刈取時における牧草の生育状況は Table 1 に示した。

草種割合は、大部分 (83~91%) がチモシーであり、残りがオーチャードグラスであった。チモシーの生育は出穂前期であり、オーチャードグラスは開花後期であった。草丈は、窒素施肥区が窒素無施肥区に比較して高かった。乾物収量は、10 kg N で頭打ちとなるまで、窒素施肥により著しく増加した。窒素施肥によって牧草の乾物収量が増大することは良く知られており^{37,129)}、本実験の結果はこれと一致する。

牧草の化学成分は Table 2 に示した。

Table 2. Chemical composition of the forages ensiled

N applied (kg/10 a)	Moisture (%)	Crude protein	Crude fat	NFE	Crude fiber (% DM)	Crude ash	WSC ^{a)}	NO ₃ -N	Gross energy (kcal/gDM)
0	72.0	7.1	3.3	52.7	30.2	6.7	9.4	0.06	4.48
5	71.1	8.3	3.6	46.4	35.2	6.5	7.6	0.06	4.48
10	71.6	9.9	3.9	45.0	34.4	6.8	6.7	0.08	4.43
15	72.9	12.5	3.9	43.2	33.5	6.9	6.4	0.08	4.54

a) Water soluble carbohydrate.

窒素施肥により著しく影響をうけた成分は、粗蛋白質、NFE 及び WSC であった。即ち、粗蛋白質含量は窒素施肥量の増加に伴って高くなり、一方、これとは逆に NFE 及び WSC 含量は窒素施肥量の増加に伴って低下した。窒素施肥量が多くなるに従って、イネ科牧草の粗蛋白質含量が高くなり、NFE 及び WSC 含量が低くなることは多くの報告^{20,32,44,45,46,47,48,107,108)}が示している。硝酸塩含量は硝酸態窒素 (NO₃-N) で乾物中 0.06~0.08% と低く、窒素施肥増加による影響は認められなかった。

サイレージの品質は Table 3 に示した。

0 kg N 区のサイレージは、pH が 5.32 と高く、フリーク評点 56 で、全窒素に対するアンモニア態窒素の割合 (NH₃-N 比率) は 16% と中等品質のものであった。窒素施肥量が増加するのに伴って、サイレージの pH、酢酸含量、酪酸含量、総酸含量、NH₃-N 含量及び NH₃-N 比率は直線的に有意 ($P < 0.05 \sim P < 0.001$) に高くなり、逆に乳酸含量及びフリーク評点は低下した。

窒素施肥量とサイレージ成分との間に成立した直交多項式は Table 4 に示した。

Table 3 及び Table 4 から、窒素施肥量が多くなるに従ってサイレージの品質が悪くなることが明らかに認められた。このことは前述の如く、窒素施肥によって、緩衝作用を有する牧草の蛋白質含量が高くなり⁶³⁾、乳酸発酵の基材となる WSC 含量が低下することに

Table 3. Quality of the silages

N applied (kg/10 a)	pH	Acids (% of fresh silage)				Flieg's mark	NH ₃ -N ^{a)}
		Lactic	Acetic	Butyric	Total		
0	5.32	1.93	0.25	0.34	2.52	56	16.2
5	5.31	1.48	0.30	0.83	2.61	33	21.6
10	5.93	1.82	0.36	0.83	3.01	37	30.2
15	5.72	1.57	0.52	1.30	3.39	24	36.7
SE	±0.06	±0.07	±0.03	±0.02	±0.03	±2	±1.0
Linear effect	***	*	***	***	***	***	***
Quadratic effect	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Cubic effect	***	***	NS	*	NS	**	NS

a) % of total nitrogen.

* P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, NS P>0.05.

Table 4. Orthogonal polynomials between silage chemical constituents (Y) and fertilizer nitrogen applied (X, kg/10 a)

pH	$Y=5.35-0.179 X+0.043 X^2-0.002 X^3$
Lactic acid (%) ^{a)}	$Y=1.93-0.261 X+0.042 X^2-0.002 X^3$
Acetic acid (%) ^{a)}	$Y=0.23+0.017 X$
Butyric acid (%) ^{a)}	$Y=0.32+0.224 X-0.029 X^2+0.001 X^3$
Total acid (%) ^{a)}	$Y=2.43+0.060 X$
Flieg's mark	$Y=51.4+3.52 X-1.20 X^2+0.06 X^3$
NH ₃ -N ^{b)}	$Y=15.7+1.40 X$

a) Fresh matter basis.

b) % of total nitrogen.

よって説明できると考える。窒素施肥によりサイレージの品質が悪くなることは多くの研究者^{30,32,42,49,82)}によって認められており、本実験の結果はこれと一致する。しかし、Jones⁴⁹⁾は、1 番刈のオーチャードグラスでは窒素施肥量が増加するに従ってサイレージの品質は悪くなったが、1 番刈のペレニアルライグラスでは、窒素施肥量に関係なく良質のサイレージが得られたと報告し、三秋⁶⁸⁾も、ローズグラスサイレージにおいて、窒素施肥による著明な影響はみられなかったと報告している。一方、和泉ら^{44,45)}、及び坂東ら²⁰⁾は高窒素施肥の牧草から良質のサイレージが得られた反面、無窒素あるいは低窒素施肥の牧草から品質の悪いサイレージが得られたと報告しており、窒素施肥がサイレージの品質に及ぼす影響は明確でない。

このように結果が異なる理由として、次のことが考えられる。第 1 に、サイレージの品

質は多くの要因によって影響されるが、これらの要因の複雑な組み合わせによって異なった結果が生ずるものと考えられる。第2に、サイレージの品質に影響する材料の成分として、前述の如く粗蛋白質とWSC含量が知られているが、これ以外の成分の影響も考えられる。これらの点についてさらに検討することにした。

4. 要 約

チモシー主体の1番刈イネ科牧草のサイレージの品質に及ぼす窒素施肥量(0, 5, 10及び15 kgN/10 a)の影響を直交多項式を用いて解析した。

窒素施肥量の増加に伴って牧草の粗蛋白質含量は高くなり、逆にNFE及びWSC含量は低下した。しかし、硝酸塩含量は影響されなかった。

窒素施肥量の増加に伴って、サイレージのpH、酢酸含量、酪酸含量、総酸含量、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率は直線的に高くなり、逆に乳酸含量は低下することが示された。

第2節 高窒素施肥による品質改善と材料成分

1. 緒 言

前節では、窒素施肥がイネ科牧草サイレージの品質に及ぼす影響を検討し、窒素施肥量が増加すると、牧草の粗蛋白質含量が高くなり、逆にWSC含量が低くなり、調製したサイレージの品質が悪くなることを明らかにした。

一方、サイレージ品質は、草種及び刈取時期によって影響される。即ち、一般にマメ科牧草はイネ科牧草に比較して良質サイレージを調製し難いとされており、また、刈取時期の影響は草種によって大きく異なることが報告されている^{2,58)}。

また、材料の水分含量がサイレージの品質に大きく影響することはつとに知られている^{128,132)}。

そこで本節では、窒素施肥がサイレージの品質に及ぼす影響を、草種、刈取時期及び水分含量との関連で検討した^{6,10)}。

2. 材料と方法

実 験 1

供試牧草には、北海道立根釧農業試験場の試験圃場で栽培されたチモシーとオーチャードグラスの1番草を用いた。

窒素施肥量には、標準窒素区と高窒素区の2水準を設け、10アール当りの施肥量は、標準窒素区ではチモシーに対し7.5 kg N、オーチャードグラスに対し5.0 kg Nとし、高窒素区は標準窒素区の倍量施用した。また、りん酸8 kgと加里10 kgは両区に同量施用した。

刈取時期は、根釧地方における1番草の早刈りと適刈りを想定して、チモシーは穂ばら

み期（早刈り）と出穂揃期（適刈り）に、オーチャードグラスは出穂始期（早刈り）と開花揃期（適刈り）に、いずれもハーベスターで収穫し、試験用サイロに埋蔵した。

サイロは、チモシーで $\phi 0.92 \times 1.50$ m、オーチャードグラスで $\phi 0.56 \times 0.88$ m のものを使用した。各処理とも詰め込み後全面をビニールで被覆したのちの 300 kg/m^2 加重を行った。

牧草とサイレージの分析は硝酸塩の定量以外根釧農業試験場で行われた²⁰⁾。硝酸塩は前節と同様に定量した。

実 験 2

供試牧草には、北海道立新得畜産試験場の試験圃場で栽培されたオーチャードグラス主体の混播 1 番草を用いた。

窒素施肥量は、低窒素区に 10 アール当り 3 kg N 、高窒素区に 12 kg N の 2 水準とし、りん酸 8 kg と加里 6 kg は両区に同量施用した。

牧草の刈取りはオーチャードグラスの出穂揃期に行い、高水分サイレージと中水分サイレージを調製した。高水分サイレージでは、モアで刈取り後、ハーベスターで $2 \sim 3 \text{ cm}$ に切断した牧草を直ちにビニールバキュームサイロに詰め込んだものである。一方、中水分サイレージは、モアによって刈取った牧草を圃場で予乾してから、ハーベスターで切断して詰め込んだが、刈取り後にわか雨にあたったため、詰め込みは翌日に行った。各原料牧草の詰め込み量は約 3.5 トンで、密封後バキュームポンプによりサイロの高さが約 $1/2$ になるまで排気を行った。

牧草とサイレージの分析は硝酸塩以外新得畜産試験場で行われた。硝酸塩の定量は前節と同様に行った。

実 験 3

供試草地には、酪農学園大学農場の 1 番刈後のオーチャードグラス草地を用い、両草地を窒素施肥水準により 2 分し、高窒素区には 10 アール当り 10 kg N 、低窒素区に 3.4 kg N 施用した。りん酸、加里はそれぞれ 10 kg 、 7 kg 同量施用した。

牧草は生育期に刈取り、直ちにカッターで約 3 cm に切断して 200 kg 容プラスチックバックサイロに埋蔵した。

牧草の水分、粗蛋白質、WSC 及び硝酸塩の定量並びにサイレージの分析は前節と同様に行った。

3. 結 果

実 験 1

牧草の化学成分は Table 5 に示した。

水分、粗蛋白質及び硝酸塩含量は、両草種とも高窒素区のものが低窒素区のものより高

Table 5. Chemical composition of the forages ensiled in Exp. 1

Forages	Stage of growth	N applied (kg/10 a)	Moisture (%)	Crude protein	WSC (% DM)	NO ₃ -N
Timothy	Booting	15.0	83.1	19.3	10.5	0.14
		7.5	82.3	15.4	9.8	0.07
	Full heading	15.0	80.9	14.1	8.8	0.08
		7.5	79.1	10.8	9.1	0.06
Orchardgrass	Early heading	10.0	83.6	17.0	10.2	0.09
		5.0	81.9	13.3	11.6	0.06
	Full blooming	10.0	79.8	13.8	6.4	0.08
		5.0	78.5	10.0	7.8	0.06

Table 6. Quality of the silages in Exp. 1

Forages	Stage of growth	N applied (kg/10 a)	pH	Acids (% of fresh silage)					Flieg's mark	NH ₃ -N ^{a)}
				Lactic	Acetic	Propionic	Butyric	Total		
Timothy	Booting	15.0	3.97	1.87	0.21	0	0	2.08	100	5.7
		7.5	4.17	1.56	0.43	0.06	0	2.05	88	9.5
	Full heading	15.0	3.89	2.02	0.39	0	0	2.41	100	9.7
		7.5	3.89	1.55	0.34	0	0	1.89	95	7.7
Orchard-grass	Early heading	10.0	4.24	1.37	0.63	0.24	0	2.24	80	8.5
		5.0	4.78	0.34	0.27	0.11	0.78	1.50	20	17.9
	Full blooming	10.0	3.83	1.48	0.29	0.02	0.05	1.84	80	5.5
		5.0	3.85	1.63	0.30	0	0.03	1.96	85	4.7

a) % of total nitrogen.

く、また、同じ施肥水準では早刈りのものが適刈りのものより高かった。一方、WSC 含量は、両草種とも高窒素施肥及び生育時期の進行によって低下したが、その影響はオーチャードグラスの方が大きかった。

サイレージの品質は Table 6 に示した。

チモシーでは、すべて pH 及び NH₃-N 比率の低い、そして酸組成の良好な良質サイレージであったが、高窒素施肥により乳酸含量が多くなり、フリーク評点が高くなった。オーチャードグラスでは、早刈りの場合、標準窒素区で多量の酪酸生成がみられ、NH₃-N 比率の高いサイレージができたが、高窒素施肥により乳酸含量が著しく増加し、酪酸生成のない、NH₃-N 比率の少ないサイレージができた。しかし、適刈りの場合、窒素施肥水準に関係なく良質のサイレージが生産された。

Table 7. Chemical composition of the forages ensiled in Exp. 2

Level of moisture	N applied (kg/10a)	Moisture (%)	Crude protein	WSC	NO ₃ -N
				(% DM)	
High	12	81.3	18.5	8.1	0.24
	3	78.1	13.6	11.5	0.06
Medium	12	67.1	19.1	9.2	—
	3	61.3	12.5	10.6	—

Table 8. Quality of the silages in Exp. 2

Level of moisture	N applied (kg/10 a)	pH	Acids (% of fresh silage)					Flieg's mark	NH ₃ -N ^{a)}
			Lactic	Acetic	Propionic	Butyric	Total		
High	12	4.17	2.06	0.30	0.01	0.04	2.41	90	7.5
	3	4.47	1.33	0.10	0.02	0.76	2.21	50	9.8
Medium	12	4.98	1.75	0.19	0.01	0.18	2.13	80	10.0
	3	5.01	1.30	0.07	0.02	0.49	1.88	58	7.1

a) % of total nitrogen.

実験 2

牧草の化学成分は Table 7 に示した。

高窒素施肥により、水分、粗蛋白質及び、NO₃-N 含量が増加し、WSC 含量は低下した。

サイレージの品質は Table 8 に示した。

高水分サイレージでは、高窒素施肥区は低窒素施肥区に比較して pH が低く、乳酸及び酢酸含量が多いが、酪酸含量は著しく低い。従って、フリーク法による評価では、低窒素施肥区の 50 点に対して高窒素施肥区は 90 点と極めてすぐれている。また、中水分サイレージでは、pH は窒素施肥水準による影響はほとんど認められなかったが、酸組成は高水分の場合とほぼ同様の傾向であった。従って、フリーク評点は高窒素施肥区で高く、低窒素施肥区で低下している。

水分含量の影響をみると、中水分化により、低窒素施肥区では、酪酸含量及び NH₃-N 比率の低下がみられたが、高窒素区では酪酸含量及び NH₃-N 比率の増加並びに乳酸含量の低下が認められた。

実験 3

牧草の化学成分は Table 9 に示した。

両草種とも高窒素施肥により、水分、粗蛋白質及び硝酸塩含量が増加した。WSC 含量

Table 9. Chemical composition of forages ensiled in Exp. 3

Forages	N applied	Moisture	Crude protein	WSC	NO ₃ -N
	(kg/10 a)	(%)		(% DM)	
Alfalfa	{ 10.0	78.6	19.2	4.33	0.17
	{ 3.3	76.4	15.3	5.16	0.07
Orchardgrass	{ 10.0	73.6	18.7	4.33	0.13
	{ 3.3	72.2	14.7	5.80	0.10

Table 10. Quality of the silages in Exp. 3

Forages	N applied (kg/10 a)	pH	Acids (% of fresh silage)				Flieg's mark	NH ₃ -N ^{a)}
			Lactic	Acetic	Butyric	Total		
Alfalfa	10.0	4.60	1.79	0.94	0	2.73	78	11.7
	3.3	5.48	0.94	0.13	1.91	2.98	13	17.0
Orchardgrass	10.0	5.68	2.06	0.56	0.60	3.22	41	21.9
	3.3	5.40	2.10	0.24	0.58	2.92	42	20.0

は再生草のためいずれも低い値であったが、高窒素施肥によりさらに低下した。

サイレージの品質は Table 10 に示した。

アルファルファでは、低窒素施肥区で酪酸含量及び NH₃-N 比率の高い品質の悪いサイレージが生産されたが、高窒素施肥により酪酸生成のない、NH₃-N 比率の低い良質サイレージができた。しかし、オーチャードグラスでは両施肥区とも品質はあまりよくなく、また、窒素施肥水準の影響は認められなかった。

4. 考 察

3 回の実験において、牧草の水分、粗蛋白質及び硝酸塩含量は、高窒素施肥によって増加することが認められた。これらの結果は多くの報告^{20,32,44,45,46,47,107,108)}と一致している。

また、これらの傾向は早刈りによって一層強まることが示された。

乾物中の WSC 含量は、牧草の生育につれて増大し、ある時期に最高値を示した後、低下するという報告⁴⁸⁾と、若い時期ほど含量が高く、生育が進むほど低下するという報告⁸⁶⁾があるが、実験 1 の結果は後者と類似している。しかし、原物中に換算すると、生育時期による差はほとんどなかった。また、WSC 含量は、高窒素施肥によって低下することが報告^{20,32,44,45,46,49,107,108)}されており、実験 2 及び実験 3 の結果はこれと一致したが、実験 1 では、オーチャードグラスでその傾向が認められたが、チモシーではあまり大きく影響されなかった。

サイレージの調製における WSC の重要性は、すでに広く認められている。即ち、Gordon

ら³²⁾は原物中全糖が2%以下あるいは全糖と粗蛋白質の比が0.5以下の場合、良質サイレージを作ることが困難であると報じ、Zimmer¹³⁸⁾は乳酸発酵を促進し、養分損失を最小限にするためには原物中2~3%のWSCが必要であると述べている。一方、蛋白質含量の高い牧草を材料にすると、品質の良好なサイレージができていくことが知られている⁶³⁾。

従って、高窒素施肥は牧草の水分含量と粗蛋白質含量を増加させ、WSC含量を低下させるので、それから調製されるサイレージの品質は悪いものができることが予想される。実際、前節では窒素施肥量が多くなるほどサイレージの品質が悪くなることを認めている。しかし、実験1のオーチャードグラスの早刈り及び実験2において、低窒素施肥区では材料に十分なWSCが存在したにもかかわらず品質の悪いサイレージができ、反対に高窒素施肥区では、3回の実験において、実験3のオーチャードグラスの場合を除いて、牧草の粗蛋白質含量が高く、WSC含量が低かったにもかかわらず良質のサイレージができた。

硝酸塩含量も窒素施肥によって影響される成分の一つである^{69,135)}。本節では、3回の実験とも高窒素施肥により牧草の硝酸塩含量は高くなったが、前節では、牧草の硝酸塩含量は窒素施肥量の増加に伴って増加せず、すべて低いものであった。従って、窒素施肥がサイレージに及ぼす影響が前節と本節とで著しく異ったのは、牧草の硝酸塩含量が関与しているように思われる。硝酸塩がサイレージ品質に及ぼす影響についてはあまり知られていないが、Wieringa¹³⁴⁾は、 NO_3^- -N含量が乾物中0.1~0.2% (著者が計算) の材料を用いてサイレージを調製すると、酪酸生成がなかったと報告している。本節において、良質のサイレージが得られた牧草の NO_3^- -N含量は、実験1、実験2及び実験3で乾物中それぞれ0.08%、0.24%及び0.17%以上であった。

また、一般に材料の水分含量を低くすると酪酸菌の生育が抑制されて良質のサイレージができることが知られており^{127,132)}、実験2の低窒素施肥区ではその傾向が認められたが、高窒素施肥区では逆に悪くなった。このようにサイレージの品質に及ぼす水分含量の影響は窒素施肥水準によって異なることが認められた。このことは、硝酸塩の影響が水分含量によって異なることを示唆している。

5. 要 約

窒素施肥がサイレージの品質に及ぼす影響を草種、刈取時期及び水分含量との関連で、3回の実験により検討した。

実験1では、チモシーとオーチャードグラスを供試し、標準窒素施肥区 (10 アール当り5.0~7.5 kg N) 及び高窒素施肥区 (10~15 kg N) を設け、早刈り (穂ばらみ期~出穂始期) 及び適刈り (出穂揃期~開花期) で収穫し、無予乾でサイレージを調製した。実験2では、オーチャードグラス主体の混播草を用い、低窒素施肥区及び高窒素施肥区には、それぞれ

10 アール当り 3 kg N 及び 12 kg N 施用し、出穂揃期に収穫し、高水分（無予乾）及び中水分（予乾）サイレージを調製した。実験 3 では、オーチャードグラス及びアルファルファの 2 番草を用い、低窒素施肥区及び高窒素施肥区には、それぞれ 10 アール当り 3.4 kg N 及び 10 kg N の施用を行い、無予乾でサイレージを調製した。

3 回の実験において、いずれも高窒素施肥によって、牧草の水分、粗蛋白質及び硝酸塩含量が増加し、WSC 含量は低下した。

サイレージの品質は、実験 3 のオーチャードグラスの場合を除いて、高窒素施肥により著しく改善された。

第 3 節 窒素施肥の影響の多面性と材料牧草の硝酸塩含量

1. 緒 言

第 1 節及び第 2 節において、窒素施肥がサイレージの品質に及ぼす影響について検討した結果、第 1 節では、窒素施肥量が増加するにつれてサイレージの品質は悪くなったが、第 2 節では逆に高窒素施肥によってサイレージの品質がよかった。

このように、窒素施肥がサイレージの品質に及ぼす影響は二面的であったが、これは牧草の硝酸塩含量の違いによってもたらされるのではないかと推察された。

本節では、この点についてさらに検討するため、年次及び番草を異にする同一圃場のオーチャードグラスを用いて、窒素施肥がサイレージの品質に及ぼす影響を調査した¹⁵⁾。

2. 材料と方法

供試圃場には、酪農学園大学試験圃場（洪積性重粘土）を用い、1 区画 50 m² (5 m × 10 m) ずつ 4 区を設け、オーチャードグラス（品種：キタミドリ）の種子を 50 cm 幅で 1971 年 5 月 24 日に条播した。窒素施肥量は、10 アール当り 0, 5, 10 及び 20 kg N の 4 段階とし、これを初年目（1971 年）は播種時に 1 回、2 年目（1972 年）及び 3 年目（1973 年）には早春、1 番刈後及び 2 番刈後の 3 回施用した。従って、2 年目及び 3 年目の年間窒素施肥量は 0, 15, 30 及び 60 kg N であった。りん酸及び加里は各区同一量とし、初年目及び 2 年目には 20 kg 及び 8 kg, 3 年目には 10 kg 及び 20 kg をそれぞれ、年 1 回、播種時（初年目）及び早春（2, 3 年目）に施用した。施用肥料は、窒素に硫酸アンモニウム、りん酸に過りん酸石灰、加里に硫酸カリウムを使用した。

牧草の刈取りは、札幌周辺における慣行の採草体系に準じ、初年目は年 1 回、2 年目と 3 年目は年 3 回行った。刈取時の生育段階は、初年目が生育期、2 年目及び 3 年目では 1 番草が出穂期、2・3 番草は生育期であった。

刈取った牧草は直ちにカッターで 2~3 cm に切断し、これを実験用サイロに詰込み、密

封した。サイロには、初年目は15ℓ容ポリバケツを使用し、これを室内に貯蔵し、2年目及び3年目は50kg容プラスチックバックサイロを用い、これを野外に放置し、いずれも約50日間貯蔵後開封し分析に供した。

牧草の水分、粗蛋白質及びWSC並びにサイレージの品質は、第1章第1節と同様に測定した。硝酸塩はMorrisら^{71,77)}の方法によって定量した。

3. 結 果

3年間におけるオーチャードグラスの乾物収量に及ぼす窒素施肥の影響をFig. 1に示した。

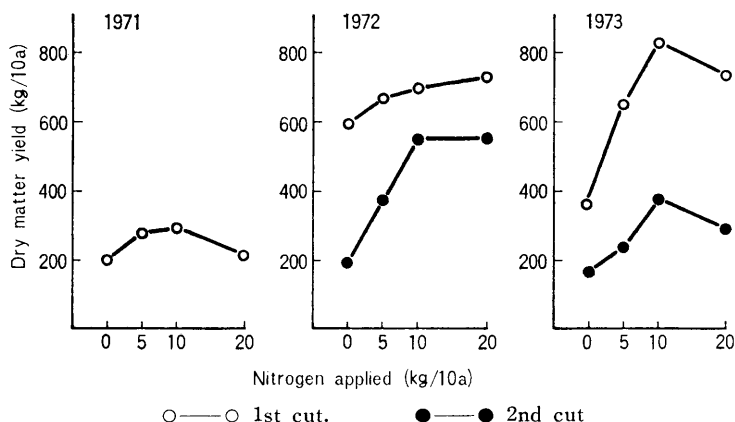


Fig. 1. Effect of nitrogen fertilization on the dry matter yield.

乾物収量は、初年目では施肥量が5~10 kg Nで最大となり、20 kg Nで減少した。2年目では1, 2番草とも10 kg Nで頭打ちとなるまで窒素施肥量の増加に伴い増加し、3年目においても10 kg Nまで同様に増加したが、20 kg Nで減少した。初年目の収量は2, 3年

Table 11. Chemical composition of the grasses and quality of the resultant silages (the first year-1971)

N applied (kg/10 a)	Grass ^{a)}					Silage					
	Moisture (%)	Crude protein	WSC	NO ₃ ⁻ -N	pH	Acids (% of fresh silage)				Flieg's mark	NH ₃ - N ^{b)}
						Lactic	Acetic	Butyric	Total		
0	77.5	17.2	6.6	0.20	5.3	1.73	0.52	0	2.25	96	16.2
5	76.3	14.8	6.1	0.21	5.9	1.84	0.57	0	2.41	96	16.8
10	78.7	20.8	5.9	0.48	5.7	2.01	0.49	0	2.50	98	13.0
20	77.7	21.3	6.5	0.49	5.4	2.09	0.40	0	2.49	99	10.9

a) Cut 24 August, vegetative stage.

b) % of total nitrogen.

目の1番草より著しく少なく、1番草の収量は2番草のそれより多かった。

牧草の化学成分及びサイレージの品質に及ぼす窒素施肥の影響は Table 11~13 に示した。

初年目の結果は Table 11 に示した。牧草の水分含量並びに WSC 含量に及ぼす窒素施肥の影響はほとんど認められなかった。粗蛋白質含量は施肥 0 kg N でも乾物中 17% と高かったが、5 kg N で低下し、10 kg N 及び 20 kg N でいずれも 21% と増加がみられた。また、硝酸塩含量は、0 kg N 及び 5 kg N においても乾物中 $\text{NO}_3\text{-N}$ で 0.2% と高く、10 kg N 及び 20 kg N では、さらにその倍の値まで増加がみられた。サイレージの品質では、pH はすべて 5 以上の高いものであったが、酪酸は存在しなかった。また、乳酸含量はいずれも高く、さらに窒素施肥量の増加に伴って増大する傾向が示された。従って、窒素施肥量の増加に伴ってフリーク評点は高くなり、これに対応して $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率は低下した。

2年目の結果は Table 12 に示した。まず牧草の成分では、窒素施肥量の増加に伴って水分含量、粗蛋白質含量及び硝酸塩含量が増加し、WSC 含量が低下した。特に硝酸塩含量は施肥 10 kg N 以上で急激に増加した。同一施肥量で番草間の比較をすると、粗蛋白質

Table 12. Chemical composition of the grasses and quality of the resultant silages (the second year-1972)

Cut- ting	N applied (kg/ 10 a)	Grass					Silage					
		Mois- ture (%)	Crude protein ———	WSC (% DM)	$\text{NO}_3\text{-N}$	pH	Acids (% of fresh silage)				Flieg's mark	$\text{NH}_3\text{-N}^{\text{d)}$
							Lactic	Acetic	Butyric	Total		
1a)	0	76.1	9.1	8.6	0.06	5.5	1.66	0.41	0.38	2.45	47	19.7
	5	77.7	10.3	8.3	0.06	5.6	1.23	0.66	0.66	2.55	26	35.5
	10	79.1	16.3	7.4	0.21	4.7	1.64	0.69	0	2.33	86	11.0
	20	79.0	16.6	7.2	0.32	4.7	1.76	0.96	0	2.72	77	11.2
2b)	0	69.3	12.2	3.8	0.08	6.2	1.46	0.43	0.04	1.93	76	12.9
	5	74.0	10.9	4.5	0.07	5.7	1.22	0.53	0.91	2.66	25	25.4
	10	74.9	16.5	3.5	0.36	5.7	1.55	1.00	0	2.55	72	19.1
	20	74.6	19.0	3.0	0.49	5.7	1.68	1.15	0	2.83	70	18.4
3c)	0	71.5	14.9	9.9	0.06	6.0	2.33	0.20	0.23	2.76	59	14.3
	5	74.4	16.8	7.4	0.08	5.8	1.77	0.37	0.31	2.45	52	19.6
	10	75.7	21.0	6.3	0.27	5.1	2.06	0.65	0	2.71	96	12.0
	20	74.7	21.3	6.3	0.26	4.9	1.98	0.53	0	2.51	97	10.7

a) Cut 9 June, heading stage.

b) Cut 8 August, vegetative stage.

c) Cut 21 September, vegetative stage.

d) % of total nitrogen.

含量は3番草>2番草≥1番草の順であった。一方、WSC含量は硝酸塩含量とは逆に1番草≥3番草>2番草の順となり、2番草は1、3番草の約1/2であった。サイレージはすべての番草で施肥5 kg Nで最も品質の悪いものができた。一方、施肥10 kg N及び20 kg Nのサイレージはすべて酪酸がなく、NH₃-N比率の低い良質のものができ、1番草及び3番草では0 kg Nのものより良質であった。

3年目の結果をTable 13に示した。なお3年目では3番草のサイレージを実施しなかった。牧草の水分含量、粗蛋白質含量及び硝酸塩含量は2年目と同様に窒素施肥量の増加に伴って増加し、WSC含量は減少した。1番草及び2番草の比較では、2年目と同様に粗蛋白質含量及び硝酸塩含量は2番草が1番草より高く、逆にWSC含量は1番草が2番草の約2倍と高かった。サイレージは、両番草とも10 kg Nまで窒素施肥量の増加に伴って酪酸含量とNH₃-N比率が高くなり、品質の低下がみられたが、20 kg Nでは酪酸のない、NH₃-N比率の低い最も良質のものができた。

Table 13. Chemical composition of the grasses and quality of the resultant silages (the third year-1973)

Cut- ting	N applied (kg/ 10 a)	Grass				Silage						
		Mois- ture (%)	Crude protein	WSC (% DM)	NO ₃ -N	pH	Acids (% of fresh silage)				Flieg's mark	NH ₃ - N ^{c)}
							Lactic	Acetic	Butyric	Total		
1a)	0	77.9	9.1	12.5	0.04	5.3	1.44	0.30	0.64	2.38	38	13.6
	5	77.0	11.1	10.2	0.04	5.5	1.22	0.09	0.75	2.06	33	14.2
	10	79.3	13.5	9.6	0.10	5.7	1.28	0.16	0.79	2.23	33	20.6
	20	79.1	17.4	9.7	0.20	5.0	1.96	0.39	0	2.35	99	13.0
2b)	0	68.9	11.8	5.4	0.06	5.5	1.84	0.08	0.36	2.28	56	10.0
	5	68.9	14.6	4.7	0.08	5.8	1.07	0.30	1.11	2.48	19	23.5
	10	70.6	16.0	4.4	0.13	5.6	1.22	0.10	1.13	2.45	22	23.4
	20	70.8	18.4	4.1	0.19	5.1	2.01	0.43	0	2.44	98	10.5

a) Cut 7 June, heading stage.

b) Cut 8 August, vegetative stage.

c) % of total nitrogen.

4. 考 察

窒素施肥によって牧草の乾物収量が增大することはよく知られている^{37,129)}。本実験において、牧草の乾物収量に及ぼす窒素施肥の影響は年次によって若干異なった。即ち、初年目では5~10 kg Nで最高収量となり、20 kg Nで減少したが、2年目及び3年目では10 kg Nで最高収量となり、それ以上では頭打ちあるいは減少することが認められた。従って、本実験における乾物収量からみた窒素施肥の適量は10 kg N (年間30 kg N) と推定

される。この量は札幌周辺で行った原田の報告³⁷⁾及び他の多くの報告^{36,129)}とほぼ一致する。

一方、窒素施肥量の増加によって、牧草の水分含量、粗蛋白質含量及び硝酸塩含量が増加し、WSC含量が減少することが知られているが^{20,32,44,45,46,47,49,107,108)}、本実験でもこれを確認した。また、夏に生育する牧草(2番草)のWSC含量は春(1番草)や秋(3番草)のそれに比べて著しく低い値を示すことが認められたが、これは石栗⁴³⁾及び榎木・大山⁵⁷⁾の報告と一致した。

サイレージの調製において、乳酸発酵を促進するためWSCの重要性はよく認識されている^{32,63,103)}。一方、サイレージの品質に及ぼす高水分及び高蛋白質の悪影響も報告⁶³⁾されている。

従って、窒素施肥は牧草の水分含量と粗蛋白質含量を増加させ、WSC含量を減少させるので、これから調製されるサイレージの品質は悪いものになることが予想される。実際、窒素施肥がサイレージの品質を悪くすることが第1節及び多くの報告^{30,32,42,49,82)}によって認められている。しかしながら、第2節及び和泉ら^{44,45)}並びに坂東ら²⁰⁾は、低窒素施肥(0~7.5 kg N)では牧草が低蛋白質で十分な量のWSCを有したにもかかわらず良質のサイレージができなかったのに対して高窒素施肥(12~15 kg N)では牧草が高蛋白質・低WSCであったが、良質のサイレージが得られたことを認めている。

本実験では5 kg N(2年目)あるいは10 kg N(3年目)まで窒素施肥量の増加に伴ってサイレージの品質が悪くなったが、それ以上の窒素施肥量では牧草自体は高蛋白質・低WSCとなったにもかかわらず、サイレージの品質は最もよいものができた。また、初年目ではすべて良質のサイレージができたが、窒素施肥量の増加に伴いさらに品質が向上することが示された。

このように高窒素施肥による高蛋白質・低WSCの牧草から良質のサイレージが生成されたことは、高蛋白質・低WSCの牧草から良質のサイレージを調製することが困難であるという従来の仮説に矛盾する。前節において、高蛋白質・低WSCの牧草から良質のサイレージができる理由として硝酸塩の影響を指摘した。即ち、調製条件によって硝酸塩含量は異なるが、牧草の硝酸塩含量がある程度以上高くなると酪酸生成がなくなることを認めている。本実験においても $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中0.19%以上の場合、例外なしに酪酸のない良質のサイレージができた。一方、Wieringa¹³³⁾は、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中0.1~0.2%の場合だけ酪酸が生成されなかったと報告している。

第1節、第2節及び本節の結果から、窒素施肥がサイレージの品質に及ぼす影響には3つの型が存在することが考えられる。即ち、(1)窒素施肥量の増加によってサイレージの

品質は悪くなる、(2) 窒素施肥量の増加によってサイレージの品質は良くなる、(3) 窒素施肥量が増加してもサイレージの品質は変わらないの3つである。これを牧草の化学成分との関連で考察すると、(1) 及び (2) では窒素施肥量の増加に伴い牧草の粗蛋白質含量は増加し、WSC 含量は減少する。そして硝酸塩含量は (1) では増加しないが、(2) では多量に蓄積する。一方、(3) では窒素施肥量の増加に伴って牧草の粗蛋白質含量は増加するが、WSC 含量と硝酸塩含量は変化せず、WSC 含量が低い場合には悪いサイレージができ、WSC 含量が高い場合には良質のサイレージができると考えられる。

ところで、硝酸塩を多量に含んだ牧草を摂取した反芻家畜が硝酸中毒を起こしやすいことは周知の事実である⁷⁵⁾。そして中毒を起こす硝酸塩の限界量は牧草の乾物中 $\text{NO}_3\text{-N}$ として 0.2% 以上と紹介されている^{75,135)}。本節及び第2節において、このような高硝酸の牧草からは例外なしに良質のサイレージができることが示された。一方、硝酸塩はサイレージの発酵過程で大部分消失することが報告されている^{60-62,72,84,85,121,122)}。

従って、高硝酸塩の牧草をサイレージにすることは、わが国のような狭い草地で多肥多収を行う環境条件において極めて有利な草類利用法であると考ええる。しかし、サイレージの発酵における硝酸塩の役割及び発酵過程におけるその消長についてはまだ十分に知られていないので以下これを検討することにした。

5. 要 約

オーチャードグラスに対して窒素を 10 アール当り 0, 5, 10 及び 20 kg の 4 段階で施用し、これが牧草の乾物収量、化学成分及び調製したサイレージの品質にどのような影響を与えるかを検討するため、同一圃場で造成段階から 3 年間にわたって実験を行った。

牧草の乾物収量は、窒素施肥量が 10 kg までは施肥量の増加に伴い増加した。

窒素施肥量の増加は牧草の水分含量、粗蛋白質含量及び硝酸塩含量を増加させ、WSC 含量を低下させた。

サイレージは、初年目においてすべて良質のものができたが、窒素施肥量の増加によって品質はさらに向上した。2 年目及び 3 年目では、それぞれ 5 kg N 及び 10 kg N 以下では窒素施肥量の増加に伴いサイレージの品質が悪くなったが、それ以上の高窒素施肥では最も良質のサイレージができた。即ち、高窒素施肥によって牧草の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.19% 以上になった場合には、高蛋白質・低 WSC 含量にもかかわらず、例外なしに酪酸生成のない良質のサイレージができることを認めた。

以上のことから、硝酸塩がサイレージの品質に好影響を与えることが示唆された。

第2章 サイレージの発酵に及ぼす硝酸塩の影響

第1節 材料牧草の化学成分、特に硝酸塩含量とサイレージ品質

1. 緒 言

前章において、サイレージ品質に及ぼす窒素施肥の影響を詳細に検討し、高窒素施肥により牧草の硝酸塩含量が高くなった場合、低窒素施肥の牧草より高蛋白質・低WSC含量にもかかわらず、サイレージの品質は高窒素施肥のものの方がすぐれていることを認め、サイレージの発酵に硝酸塩の影響が介在することを示唆した。

しかし、サイレージの発酵に及ぼす硝酸塩の影響を詳細に検討した報告は見当たらない。そこで、サイレージの品質に及ぼす硝酸塩の影響を解明するため一連の実験を行った。本節では材料牧草の硝酸塩含量、粗蛋白質含量及びWSC含量とサイレージ品質との関係を統計的に解析、検討した¹⁷⁾。

2. 材料と方法

材料牧草には、1972年と1973年の2年間にわたって、酪農学園大学試験圃場で栽培した番草及び窒素施肥量を異にしたオーチャードグラス(品種: キタミドリ)を用いた。窒素施肥は、春、1番刈後及び2番刈後にそれぞれ10アールあたり0, 5, 10及び20kgの4段階で行った。

牧草は、慣行の採草体系に従い、1番草は出穂期に、2・3番草は生育期にそれぞれ刈取り、直ちにカッターで2~3cmに切断してから、50kg容バックサイロに埋藏した。サイロは野外に放置し、約50日経過してから開封して分析に供した。

材料牧草の水分、粗蛋白質及びWSC並びにサイレージの化学分析は第1章第1節の通り行った。

統計的分析は東北大学大型計算機センターで行った。

3. 結 果

本実験で用いた材料牧草の化学成分及びサイレージの品質の平均値、標準偏差、変動係数及び範囲をTable 14に示した。

材料牧草は、刈取後直ちにサイレージに調製したため、水分含量は60%台の2例を除いて、いずれも高く、平均値は75.6%で、変動係数は5.1%と比較的小さかった。粗蛋白質含量、WSC含量及び硝酸塩($\text{NO}_3\text{-N}$)含量は乾物中、それぞれ77.~23.2%, 3.0~13.4%及び0.03~0.49%と幅広い値を示し、変動係数はいずれも大きく、それぞれ34.4%, 43.5%及び77.1%であった。

Table 14. Chemical composition of the ensiled grass and the quality of silage

		Average	Standard deviation	Coefficient of variation	Range
Grass	Moisture (%)	75.6	3.85	5.1	66.7-80.8
	Crude protein ^{a)}	14.6	5.09	34.9	7.7-23.2
	WSC ^{a)}	7.4	3.22	43.5	3.0-13.4
	NO ₃ ⁻ -N ^{a)}	0.17	0.131	77.1	0.03-0.49
Silage	pH	5.4	0.40	7.4	4.7-6.0
	Lactic acid ^{b)}	1.60	0.413	25.8	1.13-2.33
	Acetic acid ^{b)}	0.54	0.296	54.8	0.09-1.15
	Butyric acid ^{b)}	0.25	0.322	128.8	0-1.07
	Total acid ^{b)}	2.37	0.261	11.0	1.13-2.33
	Flieg's mark	63	25.9	41.1	25-100
	NH ₃ -N ^{c)}	16.2	7.10	43.8	7.2-37.9

a) % of dry matter.

b) % of fresh matter.

c) % of total nitrogen.

サイレージの品質では、pHは平均値が5.4と高く、その変動幅は小さかった。乳酸含量は新鮮物中11.3%から2.33%の範囲で比較的高く、その平均値及び変動係数は、それぞれ1.60%及び25.8%であった。同様に酢酸含量は0.09%から1.15%、酪酸含量は0%から1.07%の範囲で大きく変動し、変動係数は、それぞれ54.8%及び128.8%であった。

Table 15. Simple correlations between the variables (n=31)

		(X ₁)	(X ₂)	(X ₃)	(X ₄)	(X ₅)	(X ₆)	(X ₇)	(X ₈)	(X ₉)	(X ₁₀)
Grass	Moisture (%), (X ₁)	—									
	NO ₃ -N ^a), (X ₂)	.127	—								
	Crude protein ^a), (X ₃)	-.031	.671**	—							
	WSC ^a), (X ₄)	.281	-.634**	-.392*	—						
Silage	pH, (X ₅)	-.251	-.280	-.217	-.195	—					
	Lactic acid ^b), (X ₆)	-.263	.240	.609**	-.063	-.177	—				
	Acetic acid ^b), (X ₇)	.175	.838**	.360*	-.716**	-.183	.001	—			
	Butyric acid ^b), (X ₈)	.307	-.586**	-.562**	.453**	-.219	-.670**	-.486**	—		
	Total acid ^b), (X ₉)	.234	.480**	.478**	-.063	-.140	.433**	.488**	-.112	—	
	Flieg's mark, (X ₁₀)	.290	.485**	.670**	-.231	-.307	.720**	.223	-.875**	.055	—
	N ₃ H-N ^c), (X ₁₁)	.370*	-.153	-.326	-.037	.331	-.476**	.154	.551**	.286	-.648**

a), b), c) Same as in Table 14.

* P<0.05, ** P<0.01.

材料牧草の化学成分とサイレージ品質における相関係数を Table 15 に示した。

材料牧草の化学成分における相関関係では、粗蛋白質含量と硝酸塩含量の間には有意な正の相関、粗蛋白質含量並びに硝酸塩含量と WSC 含量の間には有意な負の相関がそれぞれ認められた。

材料牧草の化学成分とサイレージ品質の間では、水分含量と $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率、硝酸塩含量と酢酸含量・総酸含量並びにフリーク評点、そして WSC 含量と酪酸含量との間にはいずれも有意な正の相関が認められた。また、硝酸塩含量並びに粗蛋白質含量と酪酸含量、そして WSC 含量と酢酸含量との間には有意な負の相関が認められた。

サイレージの品質では、酪酸含量と $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率の間には有意な正の相関が認められた。乳酸含量と酪酸含量並びに $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率、酪酸含量と酢酸含量の間には、それぞれ有意な負の相関が認められた。

材料牧草の硝酸塩含量が乾物中 $\text{NO}_3\text{-N}$ として 0.2% 未満、それ以上及び全体をプールした場合に分けて、材料牧草の化学成分とサイレージ品質との関係を検討した結果を Fig. 2~7 に示した。

pH (Fig. 2): $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量と pH の関係では、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 未満及び全体をプールした場合には有意な相関は認められなかったが、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 以上の場合には有意な正の相関 ($r=0.590$) が認められた。粗蛋白質含量と pH の間には、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量にかかわらず有意な相関が認められなかった。一方、WSC 含量と pH の関係では、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 未満及び全体をプールした場合には有意な相関は認められなかったが、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 以上の場合には有意な負の相関 ($r=-0.794$) が認められた。

乳酸含量 (Fig. 3): $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量と乳酸含量の間には有意な相関は認められなかった。

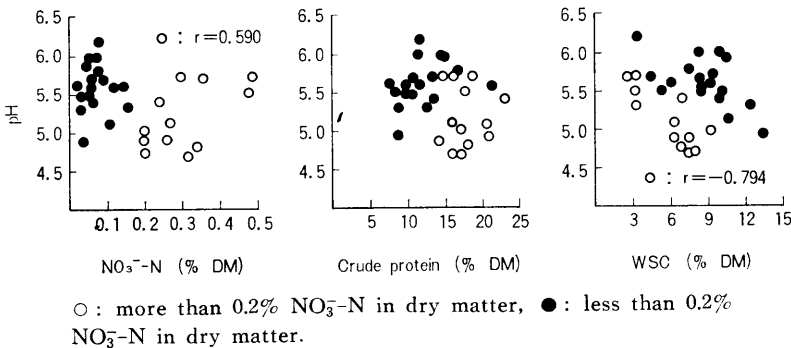


Fig. 2. Correlation between pH of silages, and nitrate, crude protein and WSC content of grasses.

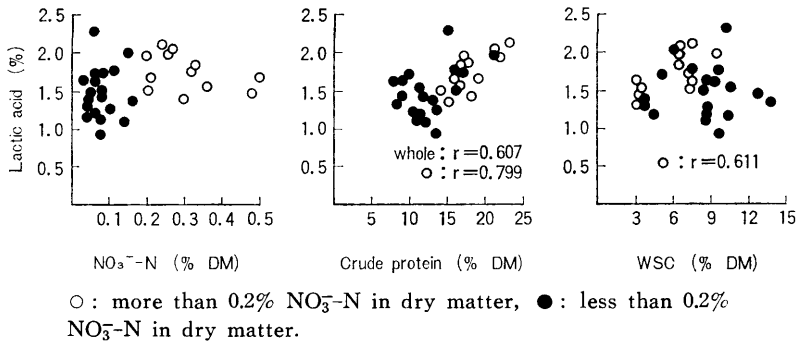


Fig. 3. Correlation between lactic acid content of silages, and nitrate, crude protein and WSC content of grasses.

粗蛋白質含量と乳酸含量の間には、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 未満の場合は有意な相関が認められなかったが、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 以上及び全体をプールした場合には有意な相関が認められ、それぞれ $r=0.797$ 及び $r=0.609$ の相関係数が得られた。また、WSC 含量と乳酸含量の間には、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 未満及び全体をプールした場合は有意な相関が認められなかったが、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 以上の場合には有意な正の相関 ($r=0.611$) が認められた。

酢酸含量 (Fig. 4): $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量と酢酸含量には、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 未満、0.2% 以上及び全体をプールした場合、いずれにも有意な正の相関が認められ、それぞれ $r=0.484$, $r=0.797$ 及び $r=0.838$ の相関係数が得られた。粗蛋白質含量と酢酸含量には、全体をプールした場合にのみ、有意な相関が認められた ($r=0.360$)。一方、WSC 含量と酢酸含量にはいずれも有意な負の相関が認められ、特に $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2 以上の場合に著しかった ($r=-0.837$)。

酪酸含量 (Fig. 5): $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量と酪酸含量の間には、全体をプールした場合に有意な

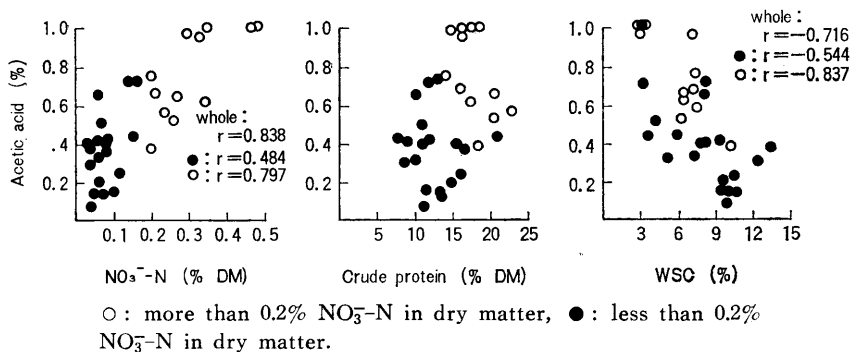


Fig. 4. Correlation between acetic acid content of silages, and nitrate, crude protein and WSC content of grasses.

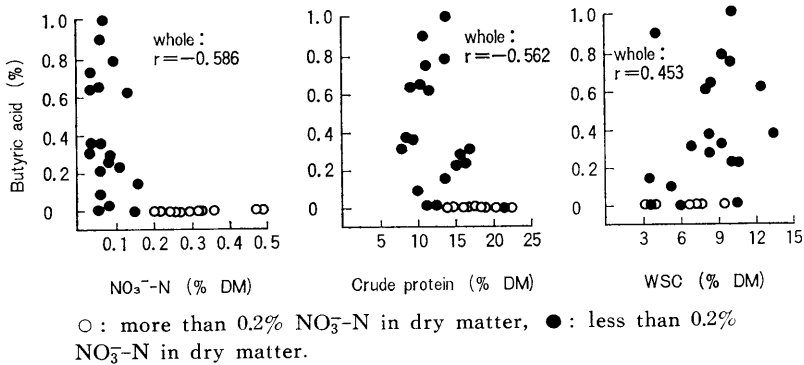


Fig. 5. Correlation between butyric acid content of silages, and nitrate, crude protein and WSC content of grasses.

負の相関 ($r = -0.586$) が認められた。しかし、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 未満及び 0.2% 以上の場合には、いずれも有意な相関は認められず、特に後者の場合は例外なしに、全て酪酸含量は 0% であった。粗蛋白質含量と酪酸含量の関係においても、全体をプールした場合に有意な負の相関 ($r = -0.562$) が認められたが、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 未満及び 0.2% 以上の場合には、いずれも有意な相関は認められず、後者の場合、粗蛋白質含量にかかわらず酪酸含量は 0% であった。また、WSC 含量と酪酸含量の間には、全体をプールした場合に有意な正の相関 ($r = 0.453$) が認められたが、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 未満及び 0.2% 以上の場合には、いずれも有意な相関は認められず、後者の場合、WSC 含量にかかわらず酪酸含量は 0% であった。

フリーク評点 (Fig. 6): $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量とフリーク評点の間には、全体をプールした場合に有意な正の相関 ($r = 0.485$) が認められたが、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 以上の場合には逆に有意な負の相関 ($r = -0.696$) が認められた。一方、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 未満の場合には有意な相関は認められなかった。粗蛋白質含量とフリーク評点の間には、

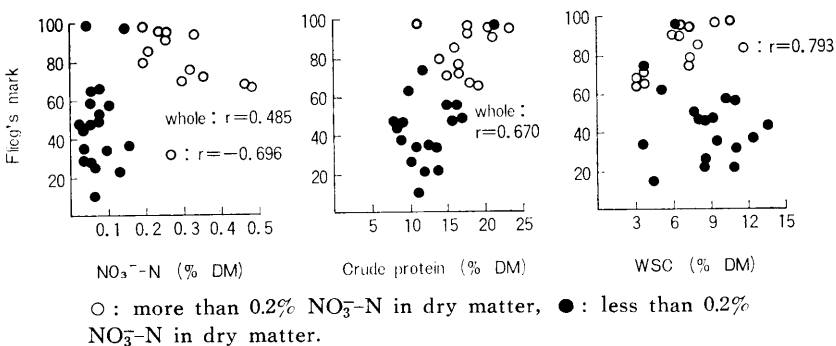


Fig. 6. Correlation between Flieg's mark of silages, and nitrate, crude protein and WSC content of grasses.

$\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 未満, 0.2% 以上及び全体をプールした場合において, いずれも正の相関が認められ, 特に全体をプールした場合の相関 ($r=0.670$) は有意であった。WSC 含量とフリーク評点の間には, $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 未満及び全体をプールした場合, 有意な相関は認められなかったが, $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 以上の場合, 有意な正の相関 ($r=0.793$) が認められた。

$\text{NH}_3\text{-N}$ 比率 (Fig. 7): $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量と $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率そして粗蛋白質含量と $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率の間には, いずれも $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量にかかわらず有意な相関は認められなかった。WSC 含量と $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率の間には, $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 未満及び全体をプールした場合, 有意な相関は認められなかったが, $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 以上の場合, 有意な負の相関 ($r=-0.678$) が認められた。

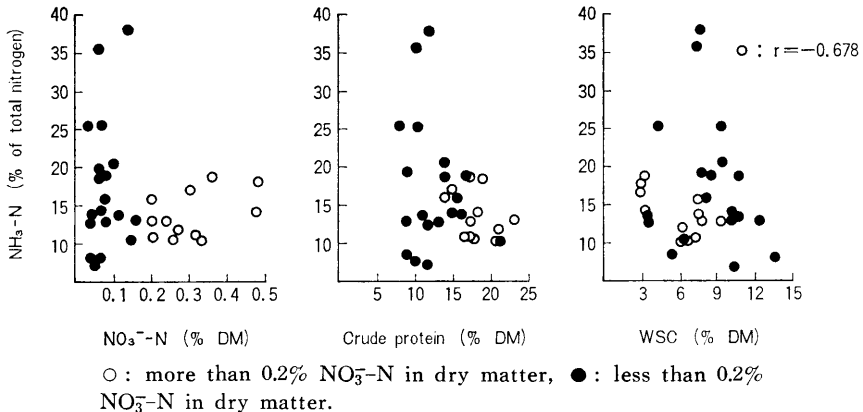


Fig. 7. Correlation between ammoniacal nitrogen content of silages, and nitrate, crude protein and WSC content of grasses.

硝酸塩がサイレージの品質に及ぼす影響を, 材料牧草の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が 0.2% 未満と 0.2% 以上の場合に分けて検討した結果を Table 16 に示した。

$\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 以上の材料牧草から調製したサイレージは, 0.2% 未満のそれに比較して, pH は低く, 乳酸, 酢酸及び総酸含量は多く, 酪酸含量は少なく, フリーク評点が高いことがそれぞれ有意に認められた。

材料牧草の硝酸塩含量, 粗蛋白質含量及び WSC 含量とサイレージ品質との間の重回帰分析の結果を Table 17 に示した。

$\text{NO}_3\text{-N}$ 含量 X_1 , 粗蛋白質含量 X_2 及び WSC 含量 X_3 (いずれも乾物中) とサイレージ品質 Y との間には, $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率を除いて有意な重相関係数が得られた。また, これらの重相関係数は, Table 15 で示した単独の材料成分とサイレージ品質との間で得られた相関

Table 16. Silage quality in relation to the nitrate content of the ensiled grass

NO ₃ ⁻ -N (% DM)	n	pH	Acids (% of fresh silage)				Flieg's mark	NH ₃ -N ^{a)}
			Lactic	Acetic	Butyric	Total		
<0.2	19	5.6±0.3	1.51±0.33	0.38±0.19	0.42±0.32	2.30±0.25	49±24	17.7±8.5
>0.2	12	5.2±0.4	1.75±0.25	0.79±0.25	0±0	2.53±0.18	84±13	13.8±3.1
Significance		*	NS	***	***	NS	***	NS

a) % of total nitrogen.
* P<0.05, *** P<0.001, NS P>0.05.

Table 17. Summary of multiple regression analysis of the silage quality on the chemical composition of ensiled grass

Silage quality (Y)	Partial regression coefficient			Constant	R
	NO ₃ ⁻ -N ^{a)} (X ₁)	Crude ^{a)} protein (X ₂)	WSC ^{a)} (X ₃)		
pH	-2.040	-0.002	-0.089	6.45	0.557
Lactic acid ^{b)}	-0.576	0.062	0.012	0.699	0.655
Acetic acid ^{b)}	0.020	-0.025	-0.030	0.791	0.909
Butyric acid ^{b)}	-0.676	-0.025	0.018	0.595	0.640
Total acid ^{b)}	0.511	0.018	-0.049	2.062	0.526
Flieg's mark	25.55	3.94	0.87	-6.20	0.675
NH ₃ -N ^{c)}	-0.89	-0.67	-0.51	30.00	0.372

a), b), c) Same as in Table 14.

係数よりいずれも高い値であった。

4. 考 察

サイレージの発酵は、化学的、物理的、微生物的な各種の要因によって支配されるが、その中で材料の成分特に WSC と蛋白質は発酵に対して大きい影響を有する⁹²⁾。一方、前章では、材料の硝酸塩含量がサイレージの品質に大きく影響することを示唆した。

牧草の WSC 含量、蛋白質含量及び硝酸塩含量は草種、生育段階、栽培条件などによって大きく影響される^{69,104,118)}。特に牧草の多収を目的として近年、多肥、多回刈の傾向がみられるが、このような条件は牧草の蛋白質含量及び硝酸塩含量を高め、WSC 含量を低くすることが知られている⁶⁹⁾。そこで本節では、窒素施肥を 4 段階 (0, 5, 10 及び 20 kg/10 a) で行ない、材料の WSC 含量、粗蛋白質含量及び硝酸塩含量を広範囲に変動させ、これらの成分と調製したサイレージの品質との関係を統計的に詳細に検討した。しかしながら、本実験における材料牧草の水分含量は 75.6±3.85% と高水分であり、WSC 含量は乾物中

7.4±3.22%と低い方に偏ったものであった (Table 14)。従って、本報では材料の母集団が高水分で低WSC含量のオーチャードグラスであるという前提で考察を進めることにする。

材料牧草の化学成分間における相関関係では、粗蛋白質含量と硝酸塩含量の間には有意な正の相関、粗蛋白質含量並びに硝酸塩含量とWSC含量には有意な負の相関がそれぞれ認められた。これらの関係は文献 118 にも記載されている。

サイレージ品質の各因子間では、酪酸含量並びに $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率と乳酸含量の間には有意な負の相関が認められ、酪酸含量と $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率の間には有意な正の相関が認められた。従って、乳酸発酵が支配的になれば、好ましくない発酵産物の生成を抑えることができることを示唆している。一方、Archibald and Kuzmeski³⁾ および高野・三股¹¹²⁾ は、多くの材料を用いてサイレージを調製し、水分含量、pH、酸組成及び揮発性塩基などにおける相関関係を広汎に研究し、pHは乳酸、揮発酸、総酸及び揮発性塩基と強い相関を示すことを認め、これらのことから、サイレージの品質の判定には、pHの検定によって、より簡易に科学的な推定がなされうることを明らかにしている。また、須藤¹⁰⁵⁾ も、pHはサイレージ品質の標識としては十分とはいえないが、最も有力な標識となることを認めている。しかしながら、本実験では、pHは他のサイレージ品質因子とは相関が認められず、前述の報告^{3,105,112)} と異なる結果が得られた。この理由の一つは、本実験のサイレージのpHの平均値は比較的高い値 (5.4) を示し、さらに変動幅が他の品質因子のそれより著しく小さかったためと考えられる。第2の理由として、材料の硝酸塩含量が高かったことが考えられる。即ち Wieringa¹³³⁾ は、高硝酸塩含量の材料を用いると、酪酸含量が少なくてもpHは高い値を示すので、pHはサイレージの品質を表示する因子としては必ずしも適当でないことを示唆しているが、本実験で用いた材料牧草には、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中0.2%以上のものが全体の39%も含まれている。また、材料の水分含量とサイレージ品質の間には、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率を除いて有意な相関関係は認められなかった。これは、材料牧草を刈取後直ちに調製したため、いずれも高水分含量であり、その変動係数は5%と小さいものであったためと考えられる。

サイレージの品質 (いわゆる発酵品質) の化学的評価法として、現在わが国では、フリーク評点及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率による方法が広く普及している¹⁰⁶⁾。本実験において、フリーク評点は $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率と強い負の相関を示し、フリーク評点の高いサイレージは $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率が低いことが認められた。以上のことから、サイレージ品質の化学的判定には、pHよりもフリーク評点あるいは $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率による方法が望ましいと考える。

材料牧草の化学成分とサイレージ品質との関係において、硝酸塩含量がサイレージ品質

に強く影響することが認められた。すなわち、硝酸塩含量は、酢酸含量、酪酸含量、総酸含量及びフリーク評点との間に有意な相関を有した。特に、酪酸含量は硝酸塩含量によって著しく影響され、両者の間には $r = -0.586$ の有意な相関係数が得られた。さらに、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 以上の場合には、例外なしに酪酸生成が全く認められなかったことは注目に値する (Table 13, Fig. 5)。

前章の第2節及び第3節では、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中それぞれ 0.08% 以上及び 0.19% 以上の場合には酪酸生成がなかったことを認めており、本実験の結果は後者とはほぼ一致している。一方、Wieringa¹³³⁾ は、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.02~0.45% の 42 点の牧草を用いてサイレージを調製し、材料の硝酸塩含量とサイレージ品質との関係を調査している。その結果、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.14~0.23% の場合には酪酸含量の少ない良質サイレージが得られたが、その範囲外のサイレージは劣質であったことを認め、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.23% 以上の牧草を用いてサイレージを調製することは好ましいことではないと報じている。即ち、硝酸塩含量が多い場合には、材料の低 WSC 含量と硝酸塩の最終還元産物であるアンモニアの生成のため、サイレージの pH が 4.2 以下に低下せず、従って酪酸生成と蛋白質分解が促進されると考察している。一方、本実験においては、前述の如く、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 以上では、高蛋白質、低 WSC 含量のため pH が比較的高いにかかわらず酪酸生成のない、フリーク評点の高いサイレージが生成されている。以上のように本実験と Wieringa¹³³⁾ の結果は大きく異っているが、これには材料牧草の硝酸塩以外の成分の違いが大きく関与しているものと考えられる。しかし、Wieringa¹³³⁾ の報告には、材料牧草の種類、硝酸塩以外の成分含量などは記載されていない。

本実験において硝酸塩含量の多い材料から酪酸生成のない良質のサイレージが調製された理由の一つとしては以下のように考えられる。即ち、硝酸塩はサイレージの発酵過程でまず亜硝酸塩に還元され、その亜硝酸塩は乳酸との反応により遊離の亜硝酸あるいは酸化窒素を生成し^{97,126)}、これが酪酸菌の生育を抑制するものと考えられる。亜硝酸が酪酸菌の生育を抑制することは、すでに食品保存の分野においてよく知られている¹³⁶⁾。

従来、酪酸菌の生育を抑制する要因としては、低 pH (あるいは高乳酸)¹²⁷⁾、低水分 (高浸透圧)^{131,137)}、及び低温^{95,132)} が知られている。しかし本実験の結果は、これらの条件が不足している場合でも、材料が高硝酸塩含量であれば酪酸菌の生育を抑制できることを示すものである。

一方、硝酸塩含量が多くなるほど酢酸含量が増加することが示された。サイレージの発酵初期にコリ型細菌が一時的に増殖することが知られているが¹⁰⁰⁾、これらの多くは電子受容体として NO_3^- を利用する¹¹⁷⁾。従って、硝酸塩含量の多い材料では、コリ型細菌による

酢酸の生成が活発になり、硝酸塩含量が多いほど酢酸含量が多くなるものと考えられる。

材料の蛋白質含量及びWSC含量とサイレージ品質との関係を研究した報告はかなり多い。即ち、大山ら⁹⁴⁾は、材料のWSC含量が多ければ良質のサイレージができると報告している。また、Gordonら³²⁾は、窒素施肥と無施肥のオーチャードグラスを用いて、材料の粗蛋白質含量並びに糖含量とサイレージ品質との関係を研究し、糖含量は乳酸含量と有意な正の相関を示したが、乳酸含量、酪酸含量並びに $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率との間には有意な相関がなかったと報じている。その結果、糖：粗蛋白質の比が0.5あるいは糖含量が新鮮物中2%以下の場合、良質サイレージを調製するためには添加物あるいは予乾が必要であるとしている。

本実験において、硝酸塩含量に関係なく全体をプールした場合、粗蛋白質含量と乳酸含量の間には正の相関、粗蛋白質含量と酪酸含量の間には負の相関、またWSC含量と酪酸含量の間には負の相関、さらにWSC含量と酪酸含量の間には正の相関がそれぞれ認められ、粗蛋白質含量が多いと乳酸発酵が促進され、酪酸発酵が抑制されること、またWSC含量が多いと酪酸発酵が促進されることが示された。これらの事実はこれまでの報告^{66,94)}と大きく異っている。サイレージ発酵におけるWSCの役割は、それ自体が乳酸発酵の基質となり、乳酸を生成し、pHを低下させ、それによって酪酸発酵や蛋白質分解を抑制することにある⁶⁶⁾とされている。即ち、サイレージ発酵における酪酸の生成は乳酸のそれに比較してかなり遅い時期に起こることが知られている⁹²⁾ので、埋蔵初期に条件が良ければ、乳酸発酵が先行し、十分な量の乳酸が生成されるとその後の酪酸発酵は抑制されると考えられる。本実験では、切断した材料を軽く圧縮しただけで密封し、さらにサイロを野外(気温: 5.5~31.5°C)に放置したことなど、サイレージの貯蔵条件は必ずしも良好なものではなかった。さらに、材料のWSC含量は低い範囲に偏ったため、たとえWSC含量が高くなっても、乳酸生成量が十分でなく、pHの低下が不十分となり、その後、一旦生成された乳酸も酪酸菌に消費され、酪酸が生成したものと考えられる。

しかしながら、WSC含量がサイレージ品質に及ぼす影響は硝酸塩含量によって異なり、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中0.2%以上では、全体の場合と逆にWSC含量が高くなるほど乳酸発酵が促進されることが認められた。このことは、さきに認めたように、材料の硝酸塩含量が高い場合には、酪酸発酵が抑制されることによって理解できる。

また、粗蛋白質含量が高くなると乳酸発酵が促進されることが認められた。この現象は、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中0.2%未満の場合には有意でなかったが、0.2%以上の場合には有意であった。従って、酪酸発酵が抑制されるという条件が存在する場合には、蛋白質は乳酸発酵を促進するように思われる。大山ら^{83,90)}は、一連の研究において、従来低品質の

サイレージができる原因とされていた高水分、高蛋白質、低WSC含量というような条件のみでは、必ずしも低品質となるとは限らないと述べているが、本実験の結果はこれを支持するものと考えられる。

また、重回帰分析の結果、材料の硝酸塩、粗蛋白質及びWSC含量は相互にからみあってサイレージ発酵に関与していることも明らかにされた。従って、サイレージの品質におよぼす硝酸塩の影響を従来から知られている主要因との関連で、さらに詳細に検討する必要があると考えられた。

5. 要 約

窒素施肥を異にするオーチャードグラスを用いて、実験用バックサイロ（容量50kg）に31点のサイレージを調製し、材料牧草の硝酸塩含量とサイレージ品質との関係を解析した。

供試した材料牧草の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量は乾物中0.03～0.49%であった。材料牧草の粗蛋白質含量と硝酸塩含量には有意な正の相関、粗蛋白質含量並びに硝酸塩含量とWSC含量には有意な負の相関がそれぞれ認められた。

サイレージの品質では、酪酸含量と $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率には有意な正の相関、酪酸含量と酢酸含量には有意な負の相関がそれぞれ認められた。フリーク評点と $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率の間には有意な負の相関があった。一方、pHは他のサイレージ品質因子と有意な相関関係を示さなかった。

材料牧草の硝酸塩含量は、サイレージの酢酸含量($r=0.838$)、酪酸含量($r=-0.586$)、総酸含量($r=0.480$)及びフリーク評点($r=0.485$)と有意な相関を示した。さらに、硝酸塩含量が高い場合（乾物中 $\text{NO}_3\text{-N}$ で0.2%以上）は、WSC含量や粗蛋白質含量にかかわらず、例外なしに酪酸生成のない良質のサイレージができた。31点のサイレージ検体をすべてブルーした場合、材料牧草のWSC含量はサイレージの乳酸含量と有意な相関関係を示さなかったが、材料牧草の硝酸塩含量が高い場合のみについてみれば有意な正の相関が認められた。

以上のことから、高硝酸塩含量の牧草はサイレージ品質の改善に寄与するものと考えられる。

第2節 硝酸塩添加の効果

1. 緒 言

前節において、硝酸塩含量の異なるオーチャードグラスを用いてサイレージを調製し、材料牧草の硝酸塩含量とサイレージ品質との関係を解析した。その結果、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中0.2%以上の材料牧草からは、例外なしに酪酸生成のない良質サイレージができる

ことを認め、硝酸塩がサイレージの品質改善に寄与することを示唆した。

そこで本節では、これを確認し、実証することを目的として、4段階の窒素施肥レベルで栽培した硝酸塩含量の異なる牧草を用いて、これに硝酸塩を3段階で添加してサイレージを調製し、材料の硝酸塩含量がサイレージの品質に及ぼす影響を検討した。また貯蔵中の損失及び微生物相についても検討を加えた¹⁸⁾。

2. 材料と方法

材料牧草には酪農学園大学試験圃場で栽培したオーチャードグラス（品種：キタミドリ）の1番草を用いた。供試圃場には、Aブロック及びBブロックの2カ所を用い、これを窒素施肥レベルにより、それぞれ4区分（1区面積50 m²）した。窒素施肥レベルは、10アール当り0, 5, 10及び20 kg Nの4段階とした。供試した材料牧草の化学組成は Table 18 に示した。

Table 18. Chemical composition of grass* ensiled

Block	N applied (kg/10 a)	Moisture (%)	Crude protein	WSC (% of DM)	NO ₃ ⁻ -N
A	0	79.5	8.9	9.4	0.04
	5	78.8	11.3	7.9	0.04
	10	81.9	16.1	7.2	0.15
	20	80.8	19.4	6.3	0.20
B	0	78.2	9.5	10.0	0.04
	5	79.9	11.8	7.9	0.04
	10	79.1	14.7	7.2	0.08
	20	79.4	16.9	6.8	0.13

* Orchardgrass (KITAMIDORI)

出穂期に刈取った牧草は、カッターで3~4 cmに切断したのち、硝酸カリウム（試薬1級、以下硝酸カリと略す）を生草重当り0, 0.15及び0.30%の3段階で添加混合し、50 kg容プラスチックバックサイロに埋蔵した。サイロは室内に放置し、約60日間経過してから開封して分析に供した。

材料牧草及びサイレージの化学分析は、第1章第1節と同様に行った。

サイレージの微生物相の測定は、試料10 gに滅菌生理食塩水90 mlを加え、ホモジナイザーで懸濁液を作り、酪酸菌を除き常法通り、希釈平板法にて行った。培養は、酵母・カビ（糸状菌）は27°C、他の菌相については32°Cで行った。なお培地の組成及び調製法は以下の通りである。

一般好気性細菌数：肉エキス0.5%，ペプトン0.5%，食塩0.5%，寒天1.5%（pH 7.0±

0.1)。

乳酸桿菌数：Acetate Agar⁵⁵⁾を用い、使用に際しては、高圧滅菌後、別に滅菌した4 M 酢酸緩衝液 (pH 5.3) を上記寒天培地 60 ml に対し、4 ml 混合したもので混釈平板を作成し、平板が固化後、1% 寒天にて重層した。

酵母菌数・糸状菌孢子数：ポテトデキストロース寒天培地 (栄研) を10% 酒石酸で使用する直前に pH を 3.5 に修正し混釈平板を作成した。

酪酸菌数 (Clostridia)：前述の如く調製したサイレージの懸濁液を 10~15⁵ 倍の 5 段階に希釈し、これを酪酸菌計数用培地 5 本に 1 ml ずつ添加し、80°C で 10 分間の加熱を加え、32°C で 4 日間培養し、ガス発生認められたものを酪酸菌が存在したものとし、最確数表⁵¹⁾を用いてサイレージ 1 g 当りの酪酸菌数を求めた。酪酸菌計数用培地の組成¹⁰⁰⁾は、ブドウ糖 1.0%，ペプトン 0.5%，K₂HP₄O 0.05%，KH₂PO₄ 0.05%，MgSO₄・7 H₂O 0.02%，FeSO₄・7 H₂O 0.001%，MnSO₄・7 H₂O 0.01%，チオグリコール酸ナトリウム 0.05%，寒天 0.08% で、pH を 7.0~7.2 に調整し、試験管に 9 ml ずつ分注滅菌したものをを用いた。

3. 結 果

1. 貯蔵中の損失及び回収率

全重量測定法¹¹³⁾による新鮮物の損失割合及び回収率は Table 19, 20 に示した。

Table 19. Storage losses and recovery in A block

N applied (kg/10 a)	Nitrate ^{a)} addition (%) ^{b)}	Losses (%) ^{c)}			Recovery ^{c)} (%)
		Top spoilage	Gaseous	Total	
0	0	2.1	2.0	4.1	95.9
	0.15	5.5	1.6	7.1	92.9
	0.30	4.7	1.7	6.4	93.6
5	0	2.8	2.0	4.8	95.2
	0.15	6.1	1.5	7.6	92.4
	0.30	4.7	1.0	5.7	94.3
10	0	2.0	1.5	3.5	96.5
	0.15	1.8	1.3	3.1	96.9
	0.30	3.9	1.3	5.2	94.8
20	0	2.8	1.3	4.1	95.9
	0.15	3.2	1.7	4.9	95.1
	0.30	5.8	1.4	7.2	92.8

- a) Potassium nitrate.
- b) % of fresh grass.
- c) % of fresh matter.

Table 20. Storage losses and recovery in B block

N applied (kg/10 a)	Nitrate ^{a)} addition (%) ^{b)}	Losses (%) ^{c)}			Recovery ^{c)} (%)
		Top spoilage	Gaseous	Total	
0	0	4.3	2.1	6.4	93.6
	0.15	7.6	2.0	9.6	90.4
	0.30	8.5	1.9	10.4	89.6
5	0	1.8	2.3	4.1	95.9
	0.15	5.4	1.3	6.7	93.3
	0.30	2.5	1.3	3.8	96.2
10	0	1.8	3.0	4.8	95.2
	0.15	5.0	1.8	6.8	93.2
	0.30	3.6	1.7	5.3	94.7
20	0	1.9	2.3	4.2	95.8
	0.15	6.0	1.7	7.7	92.3
	0.30	7.9	2.0	9.9	90.1

a), b), c) Same as in Table 19.

上部損失は1.8～8.5%の範囲で、両ブロックとも硝酸カリの添加によって増加する傾向が認められた。一方、発酵損失は1.0～3.0%と少なかったが、Aブロックの20 kg N区を除いて、硝酸カリの添加によって減少した。なお、すべてのサイレージにおいて、排汁による損失はみられなかった。新鮮物の回収率は硝酸カリの添加によってわずかに減少する傾向があったが、89.6～96.9%と高い値を示した。

2. サイレージの品質及びNO₃⁻-N含量の変化

サイレージの品質及び硝酸塩含量の変化は Table 21, 22 に示した。

pH: 硝酸カリ無添加の場合には、Aブロックでは、0 kg N区で4.3のものが、5 kg N区で4.8と高くなったが、材料牧草に硝酸塩含量の高かった10 kg N区及び20 kg N区において、いずれも4.2と低い値を示した。一方、Bブロックでは、10 kg N区で頭打ちとなるまで窒素施肥量の増加に伴って高くなった。硝酸カリを0.15%及び0.30%添加することによって、Aブロックの10 kg N区及び20 kg N区を除いて、著しいpHの低下が認められた。

乳酸含量: 硝酸カリ無添加の場合には、Aブロックでは、窒素施肥量が0 kgから5 kgへ増加すると、乳酸含量は新鮮物中1.47%から1.36%へ低下したが、10 kg N区及び20 kg N区では、それぞれ1.83%, 1.76%と高い値を示した。しかしBブロックでは、窒素施肥量が0, 5, 10及び20 kgと増加するにつれて、乳酸含量はそれぞれ1.34, 1.00, 0.77及び0.75%と低下した。一方、硝酸カリを0.15%及び0.30%添加すると、両ブロックと

Table 21. Quality of the silages in A block

N applied (kg/10 a)	Nitrate ^{a)} addition (%) ^{b)}	NO ₃ ⁻ -N (% of DM)		pH	Acids (% of fresh silage)				Flieg's mark	NH ₃ - N ^{c)}
		Material	Silage		Lactic	Acetic	Butyric	Total		
0	0	0.04	0.05	4.3	1.47	0.30	0.22	1.99	55	8.3
	0.15	0.14	0.04	4.2	1.74	0.35	0	2.09	99	5.0
	0.30	0.24	0.06	4.2	1.86	0.40	0	2.26	98	5.3
5	0	0.04	0.05	4.8	1.36	0.23	0.48	2.07	40	10.5
	0.15	0.14	0.03	4.4	1.76	0.45	0	2.21	97	6.2
	0.30	0.23	0.05	4.3	1.93	0.46	0	2.39	98	6.0
10	0	0.15	0.04	4.2	1.83	0.49	0	2.32	97	10.7
	0.15	0.26	0.05	4.2	1.91	0.49	0	2.40	97	8.2
	0.30	0.37	0.10	4.2	1.91	0.58	0	2.49	96	7.2
20	0	0.20	0.05	4.2	1.76	0.51	0	2.27	96	8.8
	0.15	0.31	0.05	4.2	2.14	0.55	0	2.69	97	8.1
	0.30	0.41	0.24	4.1	2.03	0.36	0	2.39	100	6.2

a), b) Same as in Table 19.

c) % of total nitrogen.

Table 22. Quality of the silages in B block

N applied (kg/10 a)	Nitrate ^{a)} addition (%) ^{b)}	NO ₃ ⁻ -N (% of DM)		pH	Acids (% of fresh silage)				Flieg's mark	NH ₃ - N ^{c)}
		Material	Silage		Lactic	Acetic	Butyric	Total		
0	0	0.04	0.04	4.5	1.34	0.41	0.10	1.85	57	8.0
	0.15	0.13	0.04	4.1	1.66	0.48	0	2.14	96	5.5
	0.30	0.23	0.08	4.3	1.57	0.41	0	1.98	97	5.4
5	0	0.04	0.05	5.3	1.00	0.22	0.77	1.99	28	17.4
	0.15	0.14	0.03	4.1	2.09	0.41	0	2.50	99	7.2
	0.30	0.24	0.07	4.1	1.98	0.50	0	2.48	97	7.2
10	0	0.08	0.05	5.5	0.77	0.27	1.00	2.04	16	24.1
	0.15	0.18	0.03	4.1	1.97	0.39	0	2.36	99	7.5
	0.30	0.28	0.08	4.3	1.97	0.43	0	2.40	98	8.5
20	0	0.13	0.06	5.3	0.75	0.12	1.07	1.94	17	20.0
	0.15	0.23	0.03	4.2	1.54	0.41	0	1.95	97	8.6
	0.30	0.33	0.07	4.1	1.91	0.38	0	2.29	99	7.6

a), b), c) Same as in Table 21.

も乳酸含量の増加が認められた。

酢酸含量：酢酸含量は，硝酸カリ無添加では，材料牧草の硝酸塩含量の低い場合には，窒素施肥量の増加に伴い低下した。一方，硝酸カリの添加によって，酢酸含量が増加する

傾向が認められた。しかし材料牧草の硝酸塩含量の高い A ブロックの 10 kg N 区及び 20 kg N 区では、無添加でも高い値を示し、硝酸カリの添加効果は認められなかった。

酪酸含量：酪酸含量は、硝酸カリ無添加の場合には、A ブロックにおいて、窒素施肥量の増加により、5 kg N 区まで増加したが、10 kg N 区及び 20 kg N 区では酪酸生成は認められなかった。一方、B ブロックでは、窒素施肥量の増加に伴って著しい増加がみられた。硝酸カリを 0.15% 及び 0.30% 添加すると両区とも例外なしに酪酸生成のないサイレージが生産された。

総酪酸含量：総酪酸含量は、硝酸カリ無添加の場合には、A ブロックでは、0 kg N 区及び 5 kg N 区において、それぞれ 1.99%、2.07% と大差なかったが、10 kg N 区及び 20 kg N 区において、それぞれ 2.32%、2.27% と前 2 区に比較してやや高い値を示した。しかし B ブロックでは、窒素施肥量の影響は認められなかった。一方、硝酸カリを添加することによって総酪酸含量はわずかに増加する傾向にあった。

フリーク評点：フリーク評点は、硝酸カリ無添加の場合には、A ブロックは、0 kg N 区で 55 点のものが 5 kg N 区で 40 点に低下したが、10 kg N 区及び 20 kg N 区において、それぞれ 97 点、96 点に向上した。一方、B ブロックでは、窒素施肥量が増加するにつれて、フリーク評点は低下した。しかし両ブロックとも、硝酸カリを 0.15% 及び 0.30% 添加すると、すべて 96 点以上の良質サイレージが得られた。

NH₃-N 比率：硝酸カリ無添加の場合には、A ブロックでは、0 kg N 区及び 20 kg N 区の NH₃-N 比率は 8% 台であったが、5 kg N 区及び 10 kg N 区のそれは約 11% とやや高いものであった。一方、B ブロックでは、NH₃-N 比率は、窒素施肥量の増加に伴って高くなる傾向があり、0, 5, 10 及び 20 kg N 区において、それぞれ 8.0, 17.4, 24.1 及び 20.0% であった。硝酸カリを 0.15% 及び 0.30% 添加すると、NH₃-N 比率はすべて 8% 以下に低下した。

NO₃⁻-N 含量の変化：材料の NO₃⁻-N 含量が乾物中 0.04% 以下の場合には、NO₃⁻-N 含量は、サイレージ調製によって、ほとんど変化しなかったが、材料の NO₃⁻-N 含量が乾物中 0.08% 以上の場合、NO₃⁻-N 含量は、サイレージ調製によって著しく減少した。従って、乾物中の NO₃⁻-N 含量は、材料では 0.04~0.41% の範囲で、平均値±標準偏差は 0.19±0.11% であったが、サイレージでは 0.03~0.24% の範囲となり、平均値±標準偏差は 0.06±0.04% に低下した。

3. サイレージの微生物相

A ブロックの開封時におけるサイレージの微生物相を調査した結果を Table 23 に示した。

Table 23. Microbial counts of the silages in block A
(per g fresh material)

N applied (kg/10 a)	Nitrate ^{a)} addition (%) ^{b)}	Aerobic bacteria	Lactobacilli	Moulds	Yeasts	Clostridia
0	0	7.0×10^3	1.4×10^8	1.5×10^3	3.9×10^5	1.3×10^2
	0.15	1.0×10^4	3.4×10^7	1.5×10^2	4.5×10^2	<10
	0.30	7.3×10^4	3.1×10^7	1.5×10^2	3.5×10^2	<10
5	0	7.6×10^5	4.6×10^7	3.5×10^4	1.5×10^5	9.2×10^2
	0.15	2.5×10^4	1.8×10^7	3.5×10^2	<100	4.9×10
	0.30	1.2×10^4	4.8×10^7	1.0×10^3	<100	<10
10	0	9.0×10^2	1.3×10^8	7.0×10^3	4.0×10^4	3.3×10^2
	0.15	9.0×10^2	2.3×10^8	1.5×10^3	<100	<10
	0.30	6.4×10^4	8.1×10^7	5.0×10^3	<100	1.1×10
20	0	2.1×10^4	9.1×10^7	2.0×10^2	4.0×10^2	<10
	0.15	1.7×10^4	7.6×10^7	1.5×10^2	1.0×10^2	<10
	0.30	2.8×10^4	7.3×10^7	4.1×10^4	<100	<10

a), b) Same as in Table 19.

好気性細菌数、乳酸桿菌数及び糸状菌数には、窒素施肥量及び硝酸カリの添加の影響はほとんど認められなかった。しかし酵母菌数及び酪酸菌数は、硝酸カリの添加によって著しく減少した。また、硝酸カリ無添加の場合でも、材料牧草に硝酸塩含量の高かった窒素 20 kg N 区において、酵母菌数及び酪酸菌数の減少が認められた。

4. 考 察

硝酸カリ無添加の場合、A ブロックの 10 kg N 区及び 20 kg N 区を除いて、サイレージの品質は、全体に良いものではなかったが、窒素施肥量の増加に伴ってさらに悪くなる傾向が認められた。この現象は、材料牧草の WSC 含量が乾物中 6.8~10.0% と低かったこと、さらに、その含量は窒素施肥量の増加に伴って低下し、逆に粗蛋白質含量が高くなったことによって説明できる。しかし、A ブロックの 10 kg N 区及び 20 kg N 区の材料牧草は、WSC 含量がそれぞれ乾物中 7.2% 及び 6.3% と低く、粗蛋白質含量はそれぞれ乾物中 16.1% 及び 19.4% と高いものであったが、調製されたサイレージは極めて良質であった。前章第 3 節及び本章前節において、高蛋白質・低 WSC 含量の牧草から良質のサイレージができる理由として、硝酸塩の影響を指摘した。即ち、材料の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.19% 及び 0.20% 以上の場合、粗蛋白質及び WSC 含量にかかわらず、酪酸生成のない良質のサイレージが得られることを見出した。本実験において、A ブロックの 10 kg N 区及び 20 kg N 区の材料牧草の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量は、それぞれ乾物中 0.15% 及び 0.20% と高かった。

材料牧草の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量とサイレージの品質との関係についてみると、本実験では、材料牧草の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.15% 以上 (2 例) の場合には、良質のサイレージが調製されたが、乾物中 0.13% 以下の場合には、サイレージの品質はすべて (6 例) 悪かった。一方、前述の如く、前章第 3 節及び前節において、材料牧草の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量がそれぞれ乾物中 0.19% 及び 0.20% 以上の場合には (いずれも 12 例) 確実に良質サイレージが調製されたが、前章第 3 節においては、材料牧草の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.13% 以下では、本節と同様にすべて (12 例) 品質の悪いサイレージができ、前節においては、材料牧草の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.16% 以下では、19 例中 2 例を除いて品質の悪いサイレージができた。しかし後者において、品質の良かった 2 例中 1 例は、材料牧草の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.15% であった。なお、いずれの実験においても $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.17~0.18% の材料牧草はなかった。従って、前節と本節の結果を合わせると、サイレージの品質に対して材料牧草の硝酸塩の効果が発現する境界は、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.15% 前後と推察される。さらに、材料牧草の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が境界付近では、サイレージの品質は必ず良質のものが得られるとは限らず、それは粗蛋白質含量、WSC 含量及びその他の要因によっても影響されるように思われる。しかし、これまでの実験においては境界付近での例数が少ないので、さらに $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量の異なる多くの材料牧草を用いて詳細に検討する必要がある。

また、硝酸カリを 0.15% 及び 0.30% 添加した場合、材料の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量は、乾物中 0.13~0.41% となり、調製されたサイレージは、すべて pH が低く、酪酸生成がなく、乳酸含量が高く、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率の低い、フリーク評点 96 以上の極めて良質なものであった。これらの結果は、硝酸塩がサイレージの品質を改善するという前節で得た知見を支持するものと考えられる。

一方、B ブロックにおいて、0 kg N 区の硝酸カリ 0.15% 添加の材料と、20 kg N 区の硝酸カリ無添加の材料の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量は、乾物中 0.13% と同じであったが、調製されたサイレージの品質は、前者では極めて良質であり、後者の場合、著しく悪いものであった。このように、材料の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が同じでありながら、調製されたサイレージの品質が異った理由には次のことが考えられる。第一に、硝酸塩の効果は、牧草中のものと添加したもので異なるのではないかということである。本実験では、硝酸カリ添加の場合、添加量を 0.15% と 0.30% に限定したため、材料の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量は、最低でも乾物中 0.13% であった。従って、今回より少ない添加量でも効果があるかどうか検討する必要があると考える。第二に、0 kg N 区の材料牧草は、20 kg N 区の材料牧草より粗蛋白質含量が低く、WSC 含量が高かった。このことからサイレージの品質に対する硝酸塩の効果は、前述の如く粗蛋白質及び WSC 含量などによって二次的に影響されるのではないかという推論が

なされる。しかし、以上の理由のうち、いずれによるのかは明らかでない。この問題を解決するために、硝酸カリの添加量をより広範囲に設定し、これと粗蛋白質含量、WSC 含量及び温度などの要因とを組合せ、詳細に検討する必要があると考える。

材料の硝酸塩含量が増加すると、サイレージの上部損失が増加し、発酵損失が減少する傾向が認められた。これは、サイレージ発酵において硝酸塩が炭酸ガスの生成を抑制し、それによって好気性微生物の増殖が長引いたためと思われる。しかしながら、新鮮物の回収率は 89.6~96.9% であり、これは一般の塔型サイロにおける 85~90% の値に比較して¹¹⁴⁾ かなり高いものであった。なお、貯蔵中の損失及び回収率について、今回は新鮮物で調査を行ったが、今後は乾物あるいはエネルギーの観点から、さらに詳細に検討する必要があると考える。

開封時における微生物相の調査によってサイレージの発酵過程及びその品質を正しく推定することは困難であるとされている^{66,100)}。しかし、最近開封時の微生物相は、その後の好気的変敗、いわゆる二次発酵との関連から関心がもたれるようになった²³⁾。Beck und Gross²³⁾ は、酵母の多いサイレージは二次発酵を起こしやすいと報じている。しかしながら、一般に良質サイレージには酵母が多いことが知られている¹⁰⁰⁾。

本実験において、硝酸塩含量の高い材料を用いてサイレージを調製すると、良質で、かつ酵母及び酪酸菌の少ないサイレージができることを認めたことは興味深い。ちなみに、食品微生物の分野において、硝酸塩が酵母及び酪酸菌の生育を抑制することはすでに知られている¹³⁶⁾。

ところで、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量の高い牧草を摂取した反芻家畜が硝酸中毒を起こしやすいことは周知の事実であり、一般に中毒量は、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が風乾物中 0.2% 以上と紹介されている⁷⁵⁾。本実験の材料には、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中 0.2% 以上のものが、24 例中 12 例みられたが、サイレージの $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量は、乾物中 0.24% の 1 例を除いて、すべて乾物中 0.1% 以下に低下した。サイレージ調製によって、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が減少することはよく知られており^{60,61,62,72,84,85,121,122)}、本実験の結果もこれと一致した。

以上のように、本実験は、材料の高硝酸含量がサイレージの品質を改善することを証明するとともに、サイレージ調製によって、硝酸塩含量が著しく減少することを確認した。

5. 要 約

材料の硝酸塩含量がサイレージの品質に及ぼす影響を検討するため、4 段階で窒素施肥されたオーチャードグラスを用い、これに硝酸カリを生草重当り 0, 0.15 及び 0.30% の 3 段階で添加し、50 kg 容バックサイロに埋蔵した。硝酸カリを添加すると、例外なしに pH の低い、乳酸含量の高い、酪酸生成のない、そして $\text{NH}_3\text{-N}$ の少ない良質のサイレー

ジができた。また、高窒素施肥による硝酸塩含量の高い牧草からも良質のサイレージが得られることを確認した。サイレージ調製における発酵中の損失は硝酸塩の添加によって減少した。しかし、上部損失は逆に硝酸塩の添加によって増加した。酵母菌数及び酪酸菌数は硝酸塩の添加によって著しく減少した。

第3節 硝酸塩添加とグルコース添加の相互効果

1. 緒 言

前節において、材料の硝酸塩含量がある程度以上高くなると、酪酸生成のない良質のサイレージができることを確認した。

一方、WSCはサイレージの品質に影響を及ぼす重要な要因であり、材料にWSC含量が高ければ良質なサイレージができること^{66,94,127)}、また、グルコースなど糖の添加によってサイレージの品質が顕著に改善されることが報告されている^{87,93,127)}。

そこで本節では、糖含量が異なる場合に硝酸塩の影響はどのような様相を示すかを検討するために、オーチャードグラスとアルファルファを用いて、グルコースを2段階及び硝酸カリを5段階で添加してサイレージを調製し、品質に及ぼす影響を調査した⁵⁾。

2. 材料と方法

材料牧草には、酪農学園大学試験圃場で栽培したオーチャードグラス(品種:キタミドリ)及びアルファルファ(品種:デュピー)を用いた。牧草の刈取期日、生育段階及び化学成分はTable 24に示した。

牧草は刈取り後直ちに2~3cmに切断し、所定の添加物とよく混合してから20kg容バッグサイロにできるだけ密に詰込み、密封した。

処理は、グルコースについて無添加と2%添加の2処理を設け、各々について、硝酸カリを0, 0.1, 0.2, 0.3及び1.0%の5段階で添加し各処理2反復で、1草種当り10種類のサイレージを調製した。従って結果は、2(草種)×2(グルコース)×5(硝酸カリ)の要因実験によって解析した¹³⁵⁾。

Table 24. Chemical composition of forages^{a)} ensiled

	Moisture (%)	Crude protein —————	WSC (% of DM)	NO ₃ -N —————
Orchardgrass ^{b)}	80.5	15.5	10.9	0.10
Alfalfa ^{c)}	83.1	22.1	5.4	0.09

a) Cut 5 June, 1974.

b) Heading stage.

c) Vegetative stage.

牧草の水分、粗蛋白質、WSC 及び硝酸塩の定量並びにサイレージの品質の分析は第 1 章第 1 節と同様に行った。

3. 結 果

オーチャードグラス及びアルファルファサイレージの品質はそれぞれ Table 25 及び Table 26 に示した。

オーチャードグラスでは (Table 25), 対照区 (グルコースも硝酸カリも添加しない区) のサイレージは, pH, 酪酸含量及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率の極めて高い, フリーク評点の低い, 著しく品質の悪いものであった。これに対して硝酸カリを添加すると, 乳酸含量が高くなり, pH, 酪酸含量及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率が低下し, 0.2% 以上の添加で良質のサイレージが得られた。一方, グルコース添加によってわずかに, 品質が改善される傾向が認められた。また, 硝酸塩とグルコースを併用して添加すると, これらを単独で添加した場合より, 品質がよくなった。

Table 25. Quality of the orchardgrass silages

Glucose addition (%)	Nitrate ^{a)} addition (%)	pH	Acids (% of fresh silage)				Flieg's mark	$\text{NH}_3\text{-N}^{\text{b)}$
			Lactic	Acetic	Butyric	Total		
0	0	5.69	1.18	0.38	1.46	3.02	17	44.0
	0.1	5.23	1.81	0.38	0.60	2.79	49	30.0
	0.2	4.37	2.42	0.36	0.10	2.88	80	9.4
	0.3	4.25	2.29	0.34	0.09	2.72	79	7.5
	1.0	4.32	2.25	0.36	0	2.61	100	8.7
2	0	5.20	1.69	0.10	0.95	2.74	36	15.3
	0.1	4.41	2.15	0.49	0.47	3.11	66	8.7
	0.2	4.11	3.10	0.44	0	3.55	100	7.3
	0.3	4.07	2.72	0.33	0	3.05	100	5.6
	1.0	4.27	2.70	0.40	0	3.10	100	5.8

a) Potassium nitrate.

b) % of total nitrogen.

アルファルファにおいても (Table 26), 対照区ではオーチャードグラスの場合と同様に著しく品質の悪いサイレージができた。これに対して, 硝酸カリを 0.1% 以上添加すると, 著しい乳酸含量の増加, pH, 酪酸含量及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率の低下が認められた。しかし, 硝酸カリの添加量が 0.3% 及び 1.0% と高くなると, 再び pH, 酪酸含量及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率が高くなり, 品質が低下する傾向がみられた。一方, グルコースを添加すると, 乳酸含量が著しく増加し, pH, 酪酸含量及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率がそれぞれ 4.1, 0% 及び 9.9% となり極め

Table 26. Quality of the alfalfa silages

Glucose addition (%)	Nitrate ^{a)} addition (%)	pH	Acids (% of fresh silage)				Flieg's mark	NH ₃ -N ^{b)}
			Lactic	Acetic	Butyric	Total		
0	0	5.71	0.99	1.09	1.59	3.67	5	65.9
	0.1	4.91	2.01	1.02	0.06	3.09	64	17.5
	0.2	4.98	1.80	1.25	0	3.05	70	17.9
	0.3	5.71	1.88	1.20	0.39	3.47	46	32.0
	1.0	5.76	1.49	1.66	0.05	3.20	51	36.6
2	0	4.11	3.29	0.54	0	3.83	100	9.9
	0.1	4.00	3.20	0.60	0	3.80	99	8.5
	0.2	4.03	3.02	0.52	0	3.54	100	6.3
	0.3	4.03	2.99	0.60	0	3.59	99	6.9
	1.0	4.10	2.30	0.52	0.06	2.88	80	9.1

a), b) Same as in Table 25.

て良質のサイレージが得られた。グルコースと硝酸カリを併用して添加した場合、硝酸カリの添加によって乳酸含量がわずかに低下する傾向が認められたが、いずれも極めて良質のサイレージであった。

サイレージ品質の分散分析表は Table 27 に示した。

草種は、酢酸含量及び総酸含量に対して有意であり、グルコース添加及び硝酸カリ添加は、pH、乳酸含量、酢酸含量、酪酸含量、フリーク評点及び NH₃-N 比率に対して有意であった。また、草種と硝酸カリ添加の交互作用は pH、乳酸含量及びフリーク評点に対し

Table 27. Analysis of variance for quality of the silage

Factor	f	Variance						
		pH	Acids (% of fresh silage)				Flieg's mark	NH ₃ -N ^{a)}
			Lactic	Acetic	Butyric	Total		
Material (M)	1	0.18	0.03	2.93	0.23	2.14*	53	451*
Glucose addition (G)	1	7.47***	8.43***	1.22***	0.81**	0.67	9548***	3432***
Nitrate addition (N)	4	0.74**	0.81*	0.04*	1.35***	0.15	2889**	697***
M×N	4	0.64*	0.84*	0.03	0.16	0.18	1567*	146
G×N	4	0.05	0.21	0.04*	0.38**	0.13	565	119
M×G	1	2.56***	1.69*	1.14***	0.14	0	2494*	510*
M×G×N	4	1.53***	0.02	0.41***	0.12	0.13	442	392
Error	20	0.15	0.28	0.01	0.06	0.34	442	89

a) % of total nitrogen.

* P<0.05, ** P<0.01, *** P<0.001.

て、それぞれ有意であった。グルコース添加と硝酸カリ添加との交互作用は酪酸含量に対して、また、草種、グルコース添加及び硝酸カリ添加の交互作用は酢酸含量に対して、それぞれ有意であった。

4. 考 察

グルコースも硝酸カリも添加しなかった対照区のサイレージは、オーチャードグラス及びアルファルファとも著しく品質の悪いものであった。これに対して、グルコースを2%添加するとサイレージ品質が改善されることが認められた。グルコース添加の効果は、アルファルファで顕著であったが、オーチャードグラスでは十分なものでなく、草種とグルコース添加の交互作用が、pH ($P<0.001$)、乳酸含量 ($P<0.05$)、酢酸含量 ($P<0.001$) 及びフリーク評点 ($P<0.05$) において有意であった。オーチャードグラスにおいて、予期に反して十分な効果が得られなかったのは、乳酸発酵を阻害する要因があったためと思われる。グルコース添加によってサイレージの品質が顕著に改善されるという報告は枚挙にいとまがないが^{87,93,127)}、Whittenbury ら¹³⁰⁾ は、WSC 含量の高い牧草を材料としてサイレージを調製しても品質が悪い場合があると述べ、その原因として、ヘテロ型の乳酸発酵の場合には、乳酸生成量が低くなると指摘している。

アルファルファは、オーチャードグラスより酢酸含量 ($P<0.001$) 及び総酸含量 ($P<0.05$) が高いことが認められた。名久井ら⁷⁹⁾ はアルファルファサイレージに酢酸含量が高いことを認めており、また、Archibald²⁾ は、マメ科牧草はイネ科牧草より酸生成量が多かったと報告しており、本実験の結果とはほぼ一致する。McDonald ら⁶⁷⁾ は、サイレージの型を乳酸発酵型、酢酸発酵型、酪酸発酵型、予乾型及び化学的制御型の5つに分類し、このうち酢酸発酵型は、酢酸を多量に含む以外は乳酸発酵型に類似し、暖地型牧草を材料にした場合にみられると述べている。アルファルファは、炭水化物の組成において、WSC 含量が低く、澱粉をかなり含んでいる点で暖地型牧草に類似している。しかし、アルファルファにグルコースを添加すると、乳酸発酵が促進され、酢酸含量は顕著に低下した。

オーチャードグラス及びアルファルファに対して、硝酸カリをそれぞれ0.2%及び0.1%以上添加すると、酪酸生成がほとんどなくなり、同時にpH及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率が低下し、乳酸含量及びフリーク評点が高くなり、良質のサイレージができた。前節では硝酸カリを0.15%以上添加すると、酪酸のない極めて良質のサイレージが得られることを認めており、本節の結果はこれと近似している。材料の硝酸塩含量とサイレージ品質との関係では、硝酸カリを添加しなかった場合の本章第1節及び硝酸カリを添加した前節において、乾物中の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量がそれぞれ0.20%及び0.13%以上で酪酸がなくなったのに対して、本節ではオーチャードグラス及びアルファルファにおいて、それぞれ0.24%及び0.17%

以上になると酪酸生成がほとんどなくなることを認めた。

硝酸カリとグルコースを単独で添加した場合、酪酸生成の抑制効果を比較すると、オーチャードグラスでは硝酸カリ添加の方がすぐれたが、アルファルファではグルコース添加の方がややすぐれる傾向が認められた。また、オーチャードグラスでは両者を併用した方が、どちらかを単独で添加した場合よりすぐれたが、アルファルファではグルコース添加によって十分な効果がみられたので硝酸カリとの併用効果は認められなかった。このため、酪酸含量に対する硝酸カリ添加とグルコース添加の交互作用が有意 ($P<0.01$) となったと考えられる。

一方、硝酸カリ添加による pH 及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率の低下並びに乳酸含量の増加に対する効果は、オーチャードグラスに比較してアルファルファで劣った。即ち、アルファルファでは、硝酸カリ 0.1% 及び 0.2% の添加によって酪酸含量がほとんどなくなったにもかかわらず、pH 及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率は比較的高く、さらに硝酸カリを 0.3% 以上添加すると再び pH 及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率が高くなることが認められた。サイレージにおけるアンモニアの生成は、一般に酪酸菌によってもたらされることが知られている⁶⁶⁾。しかるに、本実験において、酪酸生成がほとんどなかったにもかかわらず、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率が高かったことは、添加した硝酸カリが還元され、アンモニアが生成された可能性が考えられる。さらに、この $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率は WSC 含量の低かったアルファルファで高く、グルコース添加によって低下したことから、硝酸カリからアンモニアへの還元には材料の WSC 含量が関与しているように思われる。しかし、サイレージ発酵における硝酸塩の還元についてはほとんど知られていない。この点についての検討結果は第 3 章で述べる。

このように、硝酸カリの添加によって、pH ($P<0.01$) 及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率 ($P<0.001$) が有意に低下し、乳酸含量 ($P<0.05$)、酢酸含量 ($P<0.05$) 及びフリーク評点 ($P<0.01$) が有意に高くなり、サイレージの品質が改善されることが示された。中でも、WSC 含量が著しく低かったアルファルファに対しても効果があったことは注目に値する。即ち、従来サイレージの材料として好ましくないと考えられた高水分、低 WSC 条件においても硝酸塩含量がある程度以上高くなると、酪酸生成の著しく少ないサイレージができることを確認した。

しかし、pH ($P<0.05$)、乳酸含量 ($P<0.05$) 及びフリーク評点 ($P<0.05$) における草種と硝酸カリ添加の交互作用は有意と判定された。このことは、硝酸カリの添加効果は草種によって異なることを示唆している。従って、硝酸塩の影響を他の多くの要因との関連でさらに検討する必要があると考える。

5. 要 約

サイレージの品質に及ぼす硝酸塩の影響を草種の違い及びグルコース添加との関連で検討するため、オーチャードグラス及びアルファルファを用い、グルコース添加量2段階(0%及び2%)並びに硝酸カリ添加量5段階(0, 0.1, 0.2, 0.3及び1.0%)でサイレージを調製し、品質を調査した。

硝酸カリの添加によって、pH ($P<0.01$)、酪酸含量 ($P<0.001$) 及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率 ($P<0.001$) が有意に低下し、乳酸含量 ($P<0.05$)、酢酸含量 ($P<0.05$) 及びフリーク評点 ($P<0.01$) が有意に高くなり、オーチャードグラス及びアルファルファにおいて、硝酸カリをそれぞれ0.2%及び0.1%以上添加すると、酪酸がほとんどない良質のサイレージができた。

硝酸カリ及びグルコースの単独添加では、オーチャードグラスに対しては硝酸カリ添加の効果がすぐれたが、アルファルファでは、逆にグルコース添加の方がややすぐれ、両者の併用による効果は、オーチャードグラスにおいて認められたが、アルファルファではグルコース単独で十分に良質なサイレージができたため硝酸カリとの併用による効果は認められなかった。

WSC 含量の著しく低い材料の場合でも硝酸塩を添加すると酪酸のない良質のサイレージができることが示唆された。

第4節 硝酸塩添加、グルコース添加並びに温度の相互効果

1. 緒 言

前節において、WSC 含量が著しく低い材料に対しても、硝酸カリを0.1~0.2%以上添加すると酪酸生成がほとんどなくなり、良質のサイレージが調製されることを認めた。

一方、温度もサイレージの品質に影響する要因の一つであることが知られている。大山⁹⁵⁾は、実際のサイレージにおいて比較的高温及び低温と考えられる30°Cと15°Cの温度条件を設定し、種々の材料について発酵の様相を比較したところ、多くの場合、15°Cでは乳酸発酵が支配的になるのに対し、30°Cでは酪酸発酵が優勢になったと述べている。

本節では、硝酸塩の影響を材料の糖含量及び埋蔵温度との関連で検討するため、オーチャードグラスを用いて、温度2段階、グルコース添加量2段階、硝酸カリ添加量4段階でサイレージを調製し、品質を調査した⁸⁾。

2. 材料と方法

材料牧草には、酪農学園大学試験圃場で栽培したオーチャードグラス(品種:キタミドリ)の1番草(出穂期)を用いた。牧草の成分含量は、水分76.0%、乾物中粗蛋白質8.6%、WSC 11.9%及び $\text{NO}_3\text{-N}$ 0.06%であった。

牧草はモアアで刈取り、直ちにカッターで約1cmに切断し、所定の添加物とよく混合して、1ℓ容ポリ広口瓶に詰込み、20°C及び30°Cの恒温室に貯蔵した。

添加処理は、グルコースを添加しない区と2%添加する区を設け、各々に対して硝酸カリをそれぞれ0, 0.2, 0.4及び1.0%添加した。従って、温度2段階、グルコース添加量2段階及び硝酸カリ添加量4段階で合計16種類のサイレージを調製し、その品質を2×2×4要因実験により解析した¹³⁵⁾。

材料牧草の成分及びサイレージのpH、NH₃-Nは第1章第1節と同様の方法で測定した。乳酸はBarker and Summersonの方法⁷⁶⁾により、揮発性脂肪酸は水蒸気蒸留法⁷⁶⁾及びガスクロマトグラフィー(機種: 柳本GC8型, 検出器: FID, カラム: 2mステンレス製, 充填剤: PEG 6000, 温度150°C)により定量した。

3. 結 果

サイレージ品質はTable 28に示した。

グルコースも硝酸カリも添加しない場合は、埋蔵温度が20°C及び30°Cとも、pH、酪酸含量及びNH₃-N比率の極めて高い、著しく品質の悪いサイレージができた。

Table 28. Quality of the silages

Temperature (°C)	Glucose addition (%)	Nitrate ^{a)} addition (%)	pH	Acids (% of fresh silage)								Flieg's mark	HN ₃ - N ^{b)}
				Lact.	Acet.	Prop.	i- But.	n- But.	i- Val.	n- Val.	Total		
20	0	0	5.58	0	0.16	0.03	0.02	0.87	0	0	1.08	8	38.9
		0.2	4.71	0.67	0.81	0.01	0	0	0	0	1.49	60	17.1
		0.4	4.01	2.07	0.29	0	0	0	0	0	2.36	100	12.0
		1.0	3.92	1.96	0.12	0	0	0	0	0	2.08	100	9.4
	2	0	3.99	1.74	0.16	0	0	0.01	0	0	1.91	100	15.4
		0.2	3.92	2.46	0.18	0	0	0	0	0	2.64	100	10.3
		0.4	3.89	1.72	0.33	0	0	0	0	0	2.05	99	8.5
		1.0	3.90	1.25	0.14	0	0	0	0	0	1.39	100	6.4
30	0	0	5.32	tr.	0.47	0.21	0.06	0.77	0.10	0.07	1.68	-7	52.0
		0.2	4.72	0.60	0.87	0.01	0	0.11	0	0	1.59	16	21.4
		0.4	4.39	0.77	0.51	0.01	0	tr.	0	0	1.29	70	12.8
		1.0	4.07	1.60	0.31	0	0	0	0	0	1.91	99	10.3
	2	0	4.20	1.13	0.45	0	0	0.19	0	0	1.77	42	15.1
		0.2	4.12	1.02	0.63	0	0	0	0	0	1.65	73	11.8
		0.4	3.97	1.56	0.49	0	0	0	0	0	2.05	96	10.1
		1.0	3.98	0.99	0.21	0	0	0	0	0	1.20	99	9.8

a) Potassium nitrate. b) % of total nitrogen.

埋蔵温度が20°Cでは、グルコースを添加しない場合、硝酸カリの添加量が多くなるにつれて、乳酸含量及びフリーク評点が高くなり、pH及びNH₃-N比率は低下した。また、酪酸含量は硝酸カリを0.2%以上添加するとすべて0%となった。一方、グルコース2%添加によって、乳酸含量の多い、酪酸のほとんどない、NH₃-N比率の低い良質のサイレージが得られた。これに対して、グルコースと硝酸カリを併用添加した場合、すべて酪酸生成がなくなり、硝酸カリの添加量が多くなるにつれてNH₃-N比率は低下した。乳酸含量は硝酸カリ0.2%添加で高くなったが、それ以上の添加では逆に低下した。

埋蔵温度が30°Cにおいても、グルコースを添加しない場合、硝酸カリの添加量に応じて、pH及びNH₃-N比率が低下し、乳酸含量及びフリーク評点が高くなった。酪酸含量は、硝酸カリ0.2%添加で著しく低下し、0.4%以上の添加でなくなった。一方、グルコース添加により、乳酸含量が増加し、酪酸含量及びNH₃-N比率の低下がみられたが、その効果はNH₃-N比率を除いて20°Cの場合より劣った。グルコースと硝酸カリを併用添加すると、すべて酪酸がなくなり、硝酸カリの添加量が多くなるほどNH₃-N比率は低下したが、20°Cの場合よりやや劣った。乳酸含量は、硝酸カリ0.4%添加で最大であったが、1.0%添加では再び低下した。

サイレージ品質の分散分析表はTable 29に示した。

温度は酪酸含量 ($P<0.05$) に、グルコース添加は pH ($P<0.01$)、イソ-酪酸 ($P<0.05$)、*n*-酪酸 ($P<0.05$)、フリーク評点 ($P<0.10$) 及びNH₃-N比率 ($P<0.01$) に、また、硝酸カリ添加は pH ($P<0.05$)、酪酸 ($P<0.05$)、イソ-酪酸 ($P<0.01$)、*n*-酪酸 ($P<0.01$)、フリーク評点 ($P<0.05$) 及びNH₃-N比率 ($P<0.05$) に対してそれぞれ有意な効果を示した。ま

Table 29. Analysis of variance for quality of the silage

Factor	f	Variance										Flieg's mark	NH ₃ - N ^{a)}
		pH	Acids (% of fresh silage)										
			Lact.	Acet.	Prop.	i-But.	n-But.	i-Val.	n-Val.	Total			
Temperature (T)	1	0.05	1.10	0.19*	0.002	0.0001	0.002	0.0006	0.0003	0.22	2003	437	
Glucose addition (G)	1	1.41**	1.10	0.06	0.005	0.0004*	0.15*	0.0006	0.0003	0.09	4323*	5073**	
Nitrate addition (N)	3	0.53*	0.54	0.13*	0.003	0.0004**	0.20**	0.0006	0.0003	0.10	3381*	12294**	
T × G	1	0.01	0.03	0.002	0.002	0.0001	0.001	0.0006	0.0003	0.04	0	111	
T × N	3	0.01	0.06	0.01	0.002	0.0001	0.001	0.0006	0.0003	0.12	288	170	
G × N	3	0.33*	0.89	0.05	0.003	0.0005**	0.12**	0.0006	0.0003	0.34	1051	5715*	
Error	3	0.03	0.29	0.01	0.002	0.00001	0.007	0.0006	0.0003	0.23	239	411	

a) % of total nitrogen.

* $P<0.05$, ** $P<0.01$.

た、グルコース添加と硝酸カリ添加の交互作用は pH ($P<0.05$)、イソ-酪酸 ($P<0.01$)、*n*-酪酸 ($P<0.01$) 及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率 ($P<0.05$) に対してそれぞれ有意であった。

4. 考 察

本実験で用いた材料牧草の WSC 含量は乾物中 11.9% (新鮮物中 2.86%) と中程度のものであったが、調製されたサイレージの品質は、グルコースも硝酸カリも添加しない場合、埋蔵温度が 20°C 及び 30°C のいずれにおいても著しく悪いものであった。この結果は、前節のオーチャードグラスの対照区の結果とよく似ている。

これに対して、グルコースを 2% 添加すると乳酸含量が増加し、pH ($P<0.01$)、酪酸含量 ($P<0.05$) 及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率 ($P<0.01$) の低下がみられ、サイレージの品質が改善された。しかし、この効果は、埋蔵温度が 20°C では十分であったが、30°C ではやや不十分と思われた。ちなみに、フリーク評点に及ぼす温度の影響は 10% 水準で統計的に有意であった。大山⁹⁵⁾は、サイレージの品質に対する温度の影響について、材料の WSC 含量が高い場合には、温度の影響をうけないが、材料の WSC 含量が中程度の場合、温度が低ければ良質のサイレージが得られ、温度が高いと品質は悪くなると述べており、本実験の結果を支持する。

硝酸カリを添加すると、pH ($P<0.05$)、イソ-並びに *n*-酪酸含量 ($P<0.01$) 及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率 ($P<0.01$) が有意に低下し、酪酸含量 ($P<0.05$) 及びフリーク評点 ($P<0.05$) が有意に高くなることが示された。酪酸含量 (イソ- + *n*) は、30°C の硝酸カリを添加したサイレージにはすべて検出されなかった。これらの結果は前節の結果とよく一致している。

乳酸含量に対する硝酸カリ添加の効果は、統計的に有意ではなかったが、グルコース無添加の場合、いずれの温度においても硝酸カリの添加量が多くなるにつれて、乳酸含量が高くなったが、グルコースと併用して添加した場合、硝酸カリの添加量が多くなるにつれて乳酸含量が低下する傾向が認められた。このことは、硝酸カリの添加量が多くなるほど不良菌の増殖が抑えられ、埋蔵初期における乳酸発酵が促進され、それによって pH が急速に低下し、より少ない乳酸含量で発酵が安定したためと考えられる。

一方、pH ($P<0.05$)、イソ-酪酸 ($P<0.01$)、*n*-酪酸 ($P<0.01$) 及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率 ($P<0.05$) には、グルコース添加と硝酸カリ添加の交互作用が有意に影響することが認められた。このことは、グルコース添加だけでも十分に効果があったので、硝酸カリ添加との併用の効果が認められなかったことを示している。

以上のように、WSC 含量が中程度の材料に対して硝酸カリを 0.2% 以上添加すると、高温 (30°C) 条件においても、酪酸生成の少ない良質のサイレージができることが明らかになった。

5. 要 約

硝酸塩がサイレージの品質に及ぼす影響を材料の糖含量及び温度との関連で検討するため、オーチャードグラスにグルコースを2段階(0%及び2%)及び硝酸カリを4段階(0, 0.2, 0.4, 及び1.0%)で添加し、1ℓのポリ広口瓶に詰込み、20°C及び30°Cの恒温室に貯蔵した。

グルコースも硝酸カリも添加しない場合、いずれの温度においても、著しく品質の悪いサイレージができた。

これに対して硝酸カリを添加すると、いずれの温度においても、pH、酪酸含量及びNH₃-N比率が有意に低下し、フリーク評点が有意に高くなり、サイレージの品質が著しく改善された。また、酪酸含量は、30°Cの硝酸カリ0.2%添加したサイレージに0.11%とわずかに認められた以外、硝酸カリを添加した他のすべてのサイレージには認められなかった。

一方、グルコースの添加効果は20°Cでは十分であったが、30°Cではやや不十分であり、高温条件(30°C)がサイレージ品質に悪影響をもたらすことを認めた。

本実験の結果から、硝酸塩を添加すると、高温条件においても、良質のサイレージができることが示唆された。

第5節 硝酸塩添加、グルコース添加並びに温度と乳酸異性体分布

1. 緒 言

サイレージ調製の成否は、端的に言えば乳酸発酵と酪酸発酵のいずれが支配的になるかで決定される⁹⁵⁾。即ち、サイレージの発酵を好ましくない方向に向け、品質を劣化させる元凶は酪酸菌であることがつとに認められている⁹²⁾。一方、乳酸発酵が促進され、多量の乳酸が生成され、pHが4程度に低下すると、望ましくない微生物の増殖が抑制される¹²⁷⁾。

このように乳酸の生成は、良質サイレージ調製において重要な役割を果している。

乳酸菌によって生成される乳酸には、L(+)乳酸とD(-)乳酸の2種類の光学異性体が存在することが知られている¹³⁶⁾。このうち、D(-)乳酸は、L(+)乳酸に比較して、家畜による利用性が著しく劣ることが報告されている²⁷⁾。

しかしながら、サイレージにおける乳酸異性体含量を調査した報告は極めて少ない^{9,101)}。

そこで、本節では、前節において調製したサイレージについて、乳酸異性体含量を調査し、それに及ぼす温度、グルコース添加及び硝酸カリ添加の影響を検討した。

2. 材料と方法

前節において調製したサイレージについて乳酸異性体含量を測定した。

L(+)乳酸は、L-乳酸脱水素酵素 (L-LDH) を用いて還元された NAD を分光光度計 (波長 340 m μ) で測定することにより求めた³³⁾。また、前節で得られた乳酸含量を全乳酸含量とし、D(-)乳酸は全乳酸から L(+)乳酸を減じて求めた。

統計分析は、2 \times 2 \times 4 要因実験により行った¹³⁵⁾。

3. 結 果

サイレージの全乳酸、L(+)乳酸及び D(-)乳酸含量並びに全乳酸に対する L(+)乳酸の割合は Table 30 に、また、これらの分散分析表は Table 31 にそれぞれ示した。

全乳酸含量には、いずれの要因も有意な影響を示さなかった。しかし、グルコース添加によって全乳酸含量が高くなる傾向がみられた。硝酸カリの効果では、グルコースを添加しない場合、全乳酸含量はいずれの温度においても、添加量が多くなるにつれて高くなったが、グルコースと併用した場合、20°C 及び 30°C においてそれぞれ 0.2% 及び 0.4% まで添加量に応じて高くなったが、それ以上の添加量では低下した。また、全乳酸含量は 20°C の方が 30°C の場合より多い傾向にあった。

Table 30. Distribution of isomers of lactic acid in the silages

Temperature (°C)	Glucose addition (%)	Nitrate ^{a)} addition (%)	Lactic acid (% of fresh silage)			
			Total	L (+)		D (-)
20	0	0	0	0	(—)	0 (—)
		0.2	0.67	0.29	(43.3)	0.38 (56.7)
		0.4	2.07	0.81	(39.1)	1.26 (60.9)
		1.0	1.96	0.86	(43.9)	1.10 (56.1)
	2	0	1.74	0.78	(44.8)	0.96 (55.2)
		0.2	2.46	1.01	(41.1)	1.45 (58.9)
		0.4	1.72	0.71	(41.3)	1.01 (58.7)
		1.0	1.25	0.62	(49.6)	0.63 (50.4)
30	0	0	tr.	tr.	(—)	0 (—)
		0.2	0.60	0.29	(48.3)	0.31 (51.7)
		0.4	0.77	0.51	(66.2)	0.26 (33.8)
		1.0	1.60	0.82	(51.3)	0.78 (48.8)
	2	0	1.13	0.65	(57.5)	0.48 (42.5)
		0.2	1.02	0.55	(53.9)	0.47 (46.1)
		0.4	1.56	0.83	(53.2)	0.73 (46.8)
		1.0	0.99	0.71	(71.7)	0.28 (28.3)

a) Potassium nitrate.

Values in parentheses are % of total lactic acid.

Table 31. Analysis of variance for distribution of isomers of lactic acid in the silages

Factor	f	Variance		
		L (+)	D (-)	L (+)/total
Temperature (T)	1	0.032	0.757 ^a	790*
Glucose addition (G)	1	3.25 ^a	0.230	40
Nitrate addition (N)	3	0.132	0.150	38
T × G	1	0.0001	0.031	3
T × N	3	0.011	0.033	20
G × N	3	0.156	0.305	58
Error	33	0.035	0.121	41

a) P<0.10, *P<0.05.

L(+)乳酸含量は、グルコース添加 (P<0.10) 及び硝酸カリ添加によって高くなる傾向が認められたが、温度による影響はほとんどみられなかった。D(-)乳酸含量も、グルコース添加及び硝酸カリ添加によって高くなる傾向があったが、いずれも有意でなかった。しかし、D(-)乳酸含量は温度によって有意に影響され、20℃及び30℃における平均値はそれぞれ0.85%及び0.41%であった。全乳酸に対するL(+)乳酸の割合は、グルコース添加及び硝酸カリ添加によってほとんど影響されなかったが、温度によって大きく影響され、20℃及び30℃において、平均値はそれぞれ43.0%及び51.7%と後者が高かった (P<0.10)。

4. 考 察

全乳酸、L(+)乳酸及びD(-)乳酸含量は、いずれもグルコース添加及び硝酸カリ添加によって増加する傾向が認められたが、全乳酸に対するL(+)乳酸の割合はこれらの添加物によってほとんど影響されなかった。

温度の影響では、全乳酸及びD(-)乳酸含量は30℃で低下し、それは特に後者で著しかった (P<0.10)。一方、L(+)乳酸含量は温度にはほとんど影響されなかった。このため、L(+)乳酸の割合は30℃で著しく高くなった (P<0.10)。

大山⁹⁵⁾は、30℃と15℃との温度条件を設定し、種々の材料についてサイレージ発酵の様相を比較したところ、多くの場合、15℃では乳酸発酵が支配的になるのに対して、30℃では酪酸発酵が優勢になったと述べ、温度の違いは、微生物の生態に影響を与え、最終的に優勢する微生物の種類を決定する可能性があると指摘している。

サイレージの発酵過程における乳酸菌の動態は、まず *Streptococcus* 及び *Leuconostoc* が増殖し、2〜3日でこれらは衰退し、その後 *Lactobacilli* が優勢になるのが普通であると

されている⁵⁴⁾。このうち *Streptococcus* は比較的高温条件 (37~40°C) を好み、L(+) 乳酸を生成するのに対し、*Leuconostoc* は低温 (21~25°C) で増殖が活発となり、D(-) 乳酸を生成する^{11,136)}。また、良質サイレージにおいては、*Lactobacilli* のうち *Lactobacillus plantarum* が優勢になることがよく知られており、この菌は、ラセミ型の乳酸を生成する¹³⁶⁾。

著者は、農家が調製した牧草サイレージの乳酸異性体分布を調査した結果、高水分の無添加サイレージでは D(-) 乳酸が多かったが、高水分の蟻酸添加サイレージ及び低水分サイレージでは L(+) 乳酸が多くなることを認めたが⁹⁾、Schaadt and Johnson¹⁰¹⁾ は、トウモロコシサイレージの乳酸異性体含量と分布は刈取時期によってのみ影響され、成熟が進むほど L(+) 乳酸割合が高くなると報告している。一般に低水分及び成熟の進んだ材料は、高水分及び未熟の材料に比較して、発酵温度が高くなることが知られているので、これらの結果は、本実験によって示された如く温度の影響によって説明できると考える。

硝酸カリ添加によって、全乳酸、L(+) 乳酸及び D(-) 乳酸が増加する傾向がみられたが、いずれも有意でなく、L(+) 乳酸の割合は影響されなかった。従って、これまでの実験の結果から硝酸塩は酪酸菌及び不良菌の生育に対して特に抑制的に作用するのが特徴的であるように思われた。

5. 要 約

サイレージの全乳酸、L(+) 乳酸及び D(-) 乳酸含量に及ぼす温度、グルコース添加及び硝酸カリ添加の影響を 2×2×4 要因実験により検討した。

全乳酸、L(+) 乳酸及び D(-) 乳酸含量は、グルコース添加及び硝酸カリ添加によって高くなる傾向がみられた。L(+) 乳酸含量は温度によって影響されなかったが、全乳酸及び D(-) 乳酸含量は 30°C で低下し、それは後者で著しかった。その結果、全乳酸に対する L(+) 乳酸の割合は 30°C の場合が 20°C より高くなった。

以上のことから、高温条件は D(-) 乳酸を生成する乳酸菌の増殖を抑制するように思われた。

第 6 節 硝酸塩含量と発酵経過、特に 2,3-ブタンジオール 生成並びに硝酸塩の消長

1. 緒 言

これまでの実験において、硝酸塩がサイレージの品質改善に寄与することを示唆し、次いで、これを種々の条件下で実証した。

本節ではこの機序を知るために、材料に硝酸カリを 3 段階で添加し、サイレージの発酵

経過及び硝酸塩の消長を調べる実験を行った。なお、本実験においてこれまであまり知られていない2, 3-ブタンジオールを検出したので、その生成に及ぼす硝酸塩の影響についても検討した¹³⁾。

2. 材料と方法

材料牧草には、栃木県西那須野町農林水産省草地試験場内の圃場で栽培されたオーチャードグラス4番草(生育期)を用いた。牧草の化学組成は、水分78.4%、乾物中粗蛋白質16.6%、WSC14.3%及び $\text{NO}_3\text{-N}$ 0.10%であった。

牧草は刈取り後、直ちに5~10mmの長さに切断し、これに硝酸カリを0.05% (0.05%区)、0.2% (0.2%区) 及び0.4% (0.4%区) 添加し、よく混合した後、指でよく圧縮して実験用サイロに詰込んだ。なお、詰込量は140gであった。

実験用サイロには、250ml容ガラス瓶をゴム栓を似て密封したものを用いた。ゴム栓には、5% 硫酸・過マンガン酸カリウム溶液及び10M水酸化カリウム溶液を入れた試験管をそれぞれ装着し、発生した亜酸化窒素(N_2O) 及び一酸化窒素(NO) を吸収するように組立てた。

サイロは、30°Cの恒温室に放置し、詰込後1, 2, 4及び30日目に各処理2反復して開封し、分析に供した。

材料牧草は、凍結乾燥後、粉碎し、水分、粗蛋白質及びWSCは第1章第1節と同様の方法で定量した。サイレージについては、pHは第1章第1節と同様に、有機酸の定量及び2, 3-ブタンジオールの定性並びに定量はガスクロマトグラフィー⁵⁰⁾ (機種: 島津GC-6A型, 検出器: FID, カラム: 1.5mガラス製, 温度120→190°C, 4°C/分, 充填剤: PEG 6000) によってそれぞれ測定した。また、材料牧草、サイレージ並びにサイロに装着した試験管内溶液について、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 、 $\text{N}_2\text{O-N}$ 、 NO-N 及び $\text{NH}_3\text{-N}$ をデバルダ法^{25,26)}により分別定量した。

3. 結 果

pH、有機酸組成及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率の経時的変化はTable 32に示した。なお、品質比較の判断の資とするため、30日目のフリーク評点も併記した。

すべての区において、pHは経時的に低下し、乳酸含量、酢酸含量及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率は増加することが認められた。

硝酸カリの添加量が増加するにつれて、pHの低下が促進され、 $\text{NH}_3\text{-N}$ の生成が抑制された。乳酸含量は、0.4%区が常に最も高く推移し、0.05%区と0.2%区を比較すると、2日目まではほとんど差がなかったが、4日目においては0.2%区が高く、30日目では0.05%区が高かった。酢酸含量は、2日目までは各区に差は認められなかったが、4日目

Table 32. Process of silage fermentation

Nitrate ^{a)} addition (%)	Days after ensiling	pH	Acids (%) ^{b)}			Flieg's mark	2, 3- Butane- diol (%) ^{b)}	NH ₃ -N ^{c)}
			Lactic	Acetic	Total			
0.05 (0.12) ^{d)}	1	6.29	0	0.07	0.07		0	3.2
	2	5.70	0.80	0.13	0.93		0.28	6.0
	4	4.87	1.48	0.18	1.66		0.44	8.0
	30	4.25	2.66	0.35	3.01	100	0.42	9.8
0.20 (0.27) ^{d)}	1	6.35	0	0.03	0.03		0	2.5
	2	5.12	0.77	0.15	0.92		0.01	3.3
	4	4.41	1.71	0.32	2.03		0.02	4.8
	30	4.15	2.25	0.70	2.94	96	0.19	6.3
0.40 (0.33) ^{d)}	1	6.36	0.17	0.03	0.20		0	2.3
	2	5.06	1.03	0.14	1.17		0	2.9
	4	4.38	1.75	0.28	2.03		0	4.1
	30	4.02	3.04	0.45	3.48	100	0.05	5.9

a) Potassium nitrate.

b) % of fresh silage.

c) % of total nitrogen.

d) Content of NO₃-N of the whole ensiled material. % of dry matter. No VFA higher than propionic acid was detected.

以降 0.2% 区 > 0.4% 区 > 0.05% 区の順で推移した。

酪酸及びその他の高級揮発性脂肪酸の生成はすべての区に終始認められなかった。従って、30 日目におけるサイレージのフリーク評点は、0.05% 区、0.2% 区及び 0.4% 区において、それぞれ 100、96 及び 100 と極めて高いものであった。

本実験において、2, 3-ブタンジオールの生成が認められたのでその変化を Table 32 に示した。0.05% 区において、2 日目に 0.28% の生成がみられ、4 日目で 0.44% の最高値を示した。一方、0.2% 区及び 0.4% 区では、4 日目までその生成はほとんど認められなかったが、30 日目において、それぞれ 0.19% 及び 0.05% となり、硝酸カリの添加量が多くなるにつれて抑制されることが認められた。また、2, 3-ブタンジオールの異性体の割合は、4 日目まではすべてメソ型であったが、30 日目では D 型のわずかな生成がみられ、メソ型 97.3%、D 型 2.7% となった。

NO₃-N、NO-N 及び N₂O-N 含量の変化は Fig. 8 に示した。なお、NO₂-N は本実験で用いた分析法では定量されなかった。

NO₃-N 含量は、いずれの区においても 2 日目まで急激に減少し、その後の変化はほとんど認められなかった。NO₃-N の消失率は 0.05% が最も大きく、埋蔵過程でほとんど

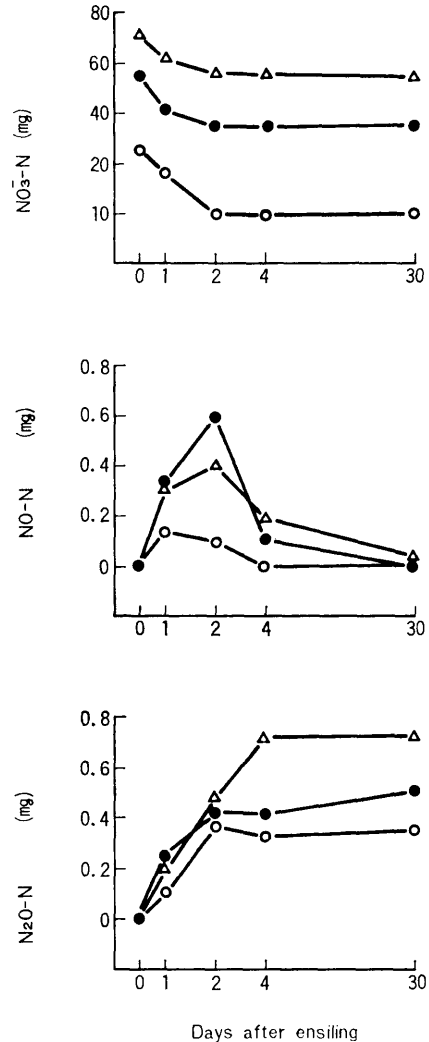
(93.4%) が消失し、0.2% 区及び 0.4% 区ではそれぞれ 35.4% 及び 28.1% であり、硝酸カリの添加量が多くなるにつれて減少した。NO-N の生成は 1~3 日目で急激に増加し、以後消失した。NO-N の生成は 0.2% 区及び 0.4% 区において著しかった。N₂O-N の生成は、いずれの区においても 4 日目で頭打ちとなるまで増加し、その順位は 0.4% 区 > 0.2% 区 > 0.05% 区と硝酸カリの添加量が多いものほど高かった。

4. 考 察

本実験において、すべての区においても良好な発酵経過を辿ったが、硝酸カリの添加量が多くなるにつれて、pH の低下が促進され、NH₃-N の生成が抑制されることが認められた。このことは、硝酸塩がサイレージの品質を改善するという、さきに得られた仮説を支持している。

乳酸含量は、4 日目で硝酸カリの添加量が多いほど高く推移したが、その後 0.2% 区の乳酸生成は緩慢となり、30 日目では 0.2% 区と 0.05% 区の順が逆になった。また、酢酸含量は、4 日目まで各区に差がみられなかったが、その後 0.2% 区で著しい増加がみられた。このことは、4 日目以降、0.05% 区及び 0.4% 区ではホモ型の乳酸発酵が優勢であったのに対し、0.2% 区ではヘテロ型の乳酸発酵が支配的となったためと考えられる。

本実験において、2, 3-ブタンジオールが検出された。これまでサイレージにおいて、2, 3-ブタンジオールを検出した例は比較的少ない。Fennessy and Barry²⁹⁾ はガスクロマトグラフィー及び質量分析計によって、2, 3-ブタンジオールを最初に同定並びに定量し、その含量は乾物中 2.4% であったと報告している。ちなみに本実験における含量は、0.05% 区の最高値を乾物中に換算すると 2.0% であった。また、Barry ら²²⁾ は、ホルマリン添加によって、2, 3-ブタンジオール含量が増加すること



○ : nitrate 0.05% added, ● : nitrate 0.2% added, △ : nitrate 0.4% added.

Fig. 8. Changes in the concentration of NO₃-N, NO-N and N₂O-N during ensilage.

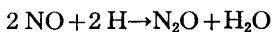
があると報告している。

しかしながら、サイレージにおける2, 3-ブタンジオールの生成経路及びその生成に及ぼす要因についてはまだ十分に明らかにされていない。従って、本実験において、硝酸塩がその生成を抑制することを認めたことは注目に値する。

一方、Whittenbury ら¹³⁰⁾ は、乳酸菌によって有機酸塩から2, 3-ブタンジオールが生成される経路を推定しているが、この場合2, 3-ブタンジオールは中性であり、有機酸塩から2, 3-ブタンジオールが生成すると塩基が放出され、これによってpHの低下が妨害されるので好しくないと述べている。また、McDonald⁶⁵⁾ は、リンゴ酸から2, 3-ブタンジオールの前駆物質であるアセトインの生成は乾物の著しい損失を伴うことを示している。

2, 3-ブタンジオールには、D(-), L(+) 及びメソ型の3つの異性体があるが、サイレージにおけるこれらの分布については報告されていない。本実験において、ガスクロマトグラフィーの分析によってこれらの異性体のうち、メソ型が大部分であることが認められた。サイレージの微生物及び家畜に及ぼす2, 3-ブタンジオールの影響は明らかでないので、この点についてはさらに検討する必要がある。

サイレージ調製によって硝酸塩含量が減少することはよく知られている^{60,61,62,72,85,121,122)}。これは、硝酸塩が微生物の作用により、一酸化窒素、二酸化窒素、亜酸化窒素、窒素ガスなどガス状の窒素に変化するためと考えられている^{97,126)}。本実験においても、硝酸塩含量は詰込後1~2日で急激に低下したが、これは硝酸塩の添加量が多くなるにつれて抑制された。また、詰込後1~2日目に急激な一酸化窒素の生成がみられ、それは4日目以後消失したが、これに代って亜酸化窒素の生成がみられた。この変化は次のように推定される。



本実験と同様な酸化窒素ガスの生成パターンはWang and Burris¹²⁶⁾によっても観察されている。

また、硝酸塩の添加量が多くなるにつれて、酸化窒素、特に亜酸化窒素の生成量が増加することが認められた。Fuerst³⁾ は、ある種の微生物は、亜酸化窒素に対して敏感に反応し、大腸菌の中には亜酸化窒素の通気によって死滅するものと報告している。一方、亜硝酸ナトリウムを含んだ製品がサイレージ添加剤として使用されており^{109,110,127)}、その作用機作は、材料と製品との反応によって発生する一酸化窒素が発酵初期における不良微生物の増殖を妨ぐためと考えられている¹⁰⁶⁾。

従って、前述の如く、硝酸塩の添加量が増加するにつれて、pHの低下が促進され、アンモニア並びに2, 3-ブタンジオールの生成が抑制されたことは、酸化窒素によって発酵初期における不良微生物の増殖が著しく抑制されたためと推測される。

以上のことから、サイレージ発酵過程における硝酸塩の還元とサイレージ品質とは密接な関係を有することが示唆された。即ち、サイレージの品質と調製中の $\text{NO}_3\text{-N}$ の変化とは密接な関係があることを認めた。従って、サイレージの品質に及ぼす硝酸塩の影響は調製中における硝酸塩の消長と関係があるように考えられた。

5. 要 約

硝酸塩含量の高い材料を用いてサイレージを調製すると良質のサイレージができることを認めたので、その機序を知るため、オーチャードグラスに対して硝酸カリを 0.05, 0.2 及び 0.4% の 3 段階で添加し、サイレージを調製し、その発酵経過及び硝酸塩の消長を調査した。また、本実験において 2, 3-ブタンジオールの生成を認めたので、その生成と硝酸塩の影響を検討した。

サイレージはいずれも良質であったが、硝酸カリの添加量が増加するにつれて、pH の低下が促進され、 $\text{NH}_3\text{-N}$ の生成が抑制された。

2, 3-ブタンジオールの生成は、硝酸カリの添加によって著しく抑制された。本実験でみられた 2, 3-ブタンジオールはほとんどメソ型であった。

$\text{NO}_3\text{-N}$ 含量は埋蔵過程の 1~2 日目で急激に低下することが認められた。 NO-N は 1~2 日目で生成されたが、4 日目以後消失し、代って $\text{N}_2\text{O-N}$ の増加がみられた。 $\text{N}_2\text{O-N}$ の生成量は、硝酸カリの添加量が多くなるにつれて増加した。

以上のことから、サイレージの品質は硝酸塩の消長と密接な関係があることが示唆された。

第 3 章 サイレージ発酵における硝酸塩の還元

第 1 節 イオン電極法による牧草の硝酸塩の定量

1. 緒 言

第 1 章並びに第 2 章において、硝酸塩含量の高い牧草を用いてサイレージを調製すると良質サイレージができることを明らかにし、次いでこの影響は、埋蔵過程における硝酸塩の消長と密接な関係があることを示唆した。従って、埋蔵過程における硝酸塩の消長を調査することは、サイレージの発酵に及ぼす硝酸塩の影響の機序を解明するため重要と考える。

牧草や飼料作物の硝酸塩は、これまでフェノール硫酸法⁷¹⁾、Morris らの方法⁷²⁾ 及び硝酸塩を亜硝酸塩あるいはアンモニアに還元し、これを比色または滴定によって定量する方法^{25,26)} などによって定量されてきた。

しかし、これらの方法はいずれも操作が煩雑で多量の試料を迅速に処理することが不可能であり、その試薬も比較的高価なものを必要とする。

最近、簡便性と迅速性をもったイオン電極法による硝酸塩の定量法が開発されたので、これが牧草の硝酸塩定量法として適切であるかどうかを検討するために、イオン電極法による再現性と回収率を調査し、従来一般的に用いられている Morris らの方法と比較した¹²⁾。

2. 材料と方法

装置並びに操作法

装置： 硝酸イオン電極（オリオン社製，92-07 型）を装置したデジタルイオンメーター（オリオン社製，701 型）を使用した。

操作法： 抽出液約 50 ml をビーカーにとり、その中に硝酸イオン電極を挿入して電極電位 (0.1 mV 精度) を読みとり、標準溶液より求めた検量線から $\text{NO}_3\text{-N}$ を定量した。

イオン電極法による定量法の検討

(1) 水抽出法と煮沸時間の影響： オーチャードグラスの乾燥・粉碎試料 0.5 g あるいは 1.0 g に水 50 ml を加え、10, 20, 30 及び 40 分間往復振とう抽出し、抽出液のろ液についてイオン電極法により $\text{NO}_3\text{-N}$ を定量した。

(2) 水抽出法と煮沸抽出法との比較： 7 点のオーチャードグラスの乾燥・粉碎試料 1.0 g に水 50 ml 加え、30 分間振とう抽出並びに 30 分間煮沸抽出した場合の $\text{NO}_3\text{-N}$ の定量値をイオン電極法により比較した。

(3) イオン電極法の精度の検討： イオン電極法の精度を検討するため、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量の異なるオーチャードグラスの乾草・粉碎試料 5 点について、おのおの 5 回の反復測定による定量値の再現性をみるとともに、硝酸塩含量既知の試料に硝酸ナトリウムを 3~4 段階で添加し、回収率を調査した。

(4) イオン電極法と Morris らの方法による定量値の比較： イオン電極法と従来よく使用されている Morris らの方法による $\text{NO}_3\text{-N}$ の定量値を 32 点のオーチャードグラス、アルファルファ及びトウモロコシの乾燥・粉碎試料を用いて比較した。Morris らの方法⁷⁾は、宮崎⁷¹⁾が紹介している方法に準じて行った。

3. 結果と考察

1. 牧草からの $\text{NO}_3\text{-N}$ の抽出法

乾燥された試料からの $\text{NO}_3\text{-N}$ の抽出は、従来煮沸によって行われてきた⁷¹⁾。今回、イオン電極法による分析の抽出法として、より簡便な水抽出法を試み、煮沸抽出法と比較した結果を Fig. 9 及び Table 33 に示した。

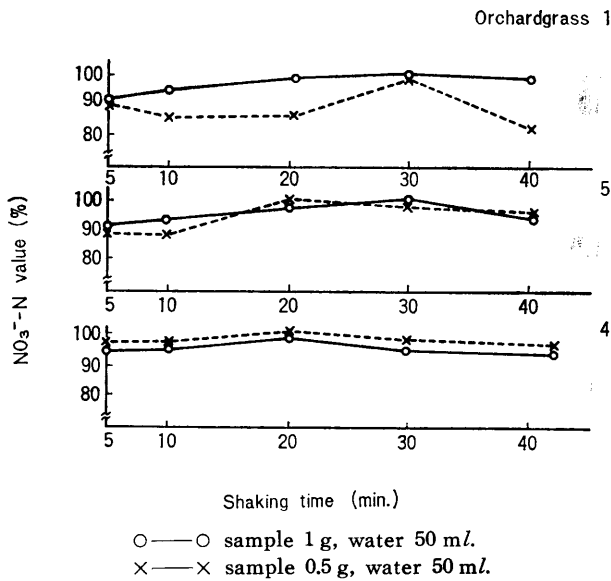


Fig. 9. Effect of shaking time on yield of nitrate.

Table 33. Effect of method of extraction with water on nitrate content in plant materials

Sample		NO ₃ -N (mg %)	
		Shaking for 30 min.	Boiling for 30 min.
Orchardgrass	1	32.0	30.7
"	2	52.8	49.3
"	3	77.7	79.2
"	4	170.5	175.8
"	5	233.0	217.0
"	6	389.4	393.1
"	7	394.6	387.1

まず、水抽出法による振とう抽出時間とイオン電極法による定量値の関係は Fig. 9 の通りである。即ち、抽出時間 20～30 分で定量値が最大となることが知られた。

つぎに、水抽出法と煮沸抽出法による定量値の比較は Table 33 の通りである。定量値は両抽出法で極めて近似している。

以上のことから、牧草からの NO₃-N の抽出は 30 分間水で振とう抽出する方法を採用することにした。

2. イオン電極法の精度

硝酸イオン電極を用いて測定した電位と NO₃-N との検量線は Fig. 10 に示した。標準

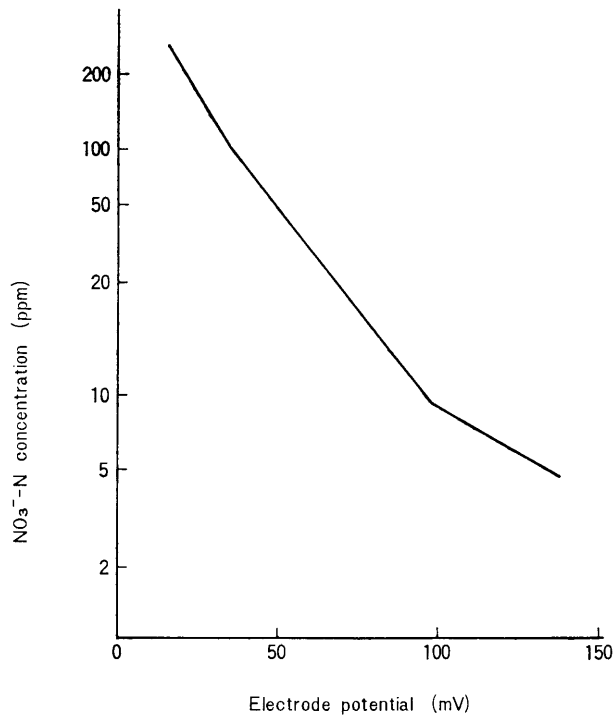


Fig. 10. Standard curve obtained with the nitrate electrode.

溶液中の NO_3^- -Nが変化するとネルンスト式に従って硝酸電極の電位が変化するが、 NO_3^- -Nが10~20 ppmの範囲では NO_3^- -Nの対数と電位がよく直線関係を示し、直線の勾配もネルンスト式におおむね一致した。しかし、10 ppm以下の NO_3^- -Nでは勾配が急激となり直線性が失われることが認められた、また、応答時間も、 NO_3^- -Nが低くなるにつれて長くなった。なお、今回の実験において、測定時に抽出液の撹拌を行わなかったが、今後は測定時に抽出液の撹拌を行い、安定までの所要時間を短縮するとともに、試料の採取量を加減することにより、検量線の直線部分で測定を行い、精度を向上させることが必要であると考ええる。

イオン電極法による NO_3^- -Nの定量値の再現性はTable 34に示した。 NO_3^- -N含量の異なるオーチャードグラスの反復測定における変動係数は0.7~3.8%であった。特に、家畜飼養上問題となる NO_3^- -N含量の高い試料で高い精度が示された。Paul and Carlson⁶⁶⁾及びMilhamら⁷⁰⁾も同様に、イオン電極法により、いろいろな植物材料の NO_3^- -N含量を測定し、その変動係数はそれぞれ3.1%及び1.52~2.61%であったと報告している。一方、宮崎⁷¹⁾はフェノール硫酸法及びMorrisらの方法による変動係数は前者で1.36%、後方で3.05%と報告しており、イオン電極法による定量法が、従来の方法と同等以上の正確性を

Table 34. Reproducibility of determination by the electrode method

Sample		Number of determination	Mean NO ₃ ⁻ -N concentration (mg %)	Standard deviation (mg %)	Coefficient of variation (%)
Orchardgrass	1	5	36.6	1.38	3.8
"	2	5	47.3	1.23	2.6
"	3	5	74.9	1.35	1.8
"	4	5	177.4	3.19	1.8
"	6	5	371.9	2.60	0.7

Table 35. Recovery of added nitrate from plant by the electrode method

Sample		NO ₃ ⁻ -N in plant (mg)	Added NO ₃ ⁻ -N (mg)	Recovery (%)
Orchardgrass	1	0.242	0.501	76.2
			1.002	92.2
			2.004	94.8
			4.008	97.8
"	2	0.281	0.501	90.3
			1.002	92.9
			2.004	99.3
			4.008	99.9
"	4	1.273	0.501	100.3
			1.001	99.1
			2.004	100.9
"	6	1.819	0.501	100.9
			1.002	102.0
			2.004	100.9

有していることが示唆された。

イオン電極法による NO₃⁻-N の回収率は Table 35 に示した。イオン電極法による NO₃⁻-N の回収率は、NO₃⁻-N 含量の低い試料でやや低かったが、添加 NO₃⁻-N 量の増加に伴い 100% 近くになった。また、NO₃⁻-N 含量の高い試料では、いずれの添加量においてもほぼ 100% の回収率が示された。Paul and Carlson⁹⁶⁾ 及び Milham ら⁷⁰⁾ は、イオン電極法による回収率は、いずれもほぼ 100% であったと報告し、特に後者の研究者は、デバルダ法のそれよりすぐれていることを認めた。

以上のように、再現性及び回収率から判断して、イオン電極法は従来の方法と比較して

同等以上の精度をもつ分析法であると考えられた。

3. イオン電極法と Morris らの方法による定量値の比較

イオン電極法と Morris らの方法による牧草 32 点の NO_3^- -N の定量値の比較は Fig. 11 の通りである。即ち、両者の間に $r=0.983$ ($P<0.001$) の相関がみられ、 $Y=0.872 X-12.983$ の回帰式が得られ、定量値はほぼ一致した。Paul and Carlson⁹⁶⁾ 及び Milham ら⁷⁰⁾ は、イオン電極法による定量値はフェノール硫酸法及びデバルダ法によるそれとよく一致することを認めている。

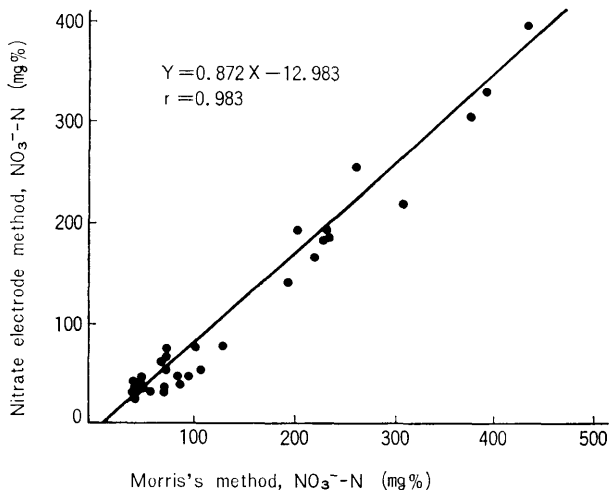


Fig. 11. Comparison of nitrate electrode method and Morris's method for nitrate in 32 plant materials.

Morris らの方法は、従来飼料の硝酸塩の分析法として最も簡便な方法とされているが、1日に10点程度の分析しかできず、ルーチンワークとして用いる方法としては必ずしも適していない。それに対してイオン電極法は、操作法が極めて簡便かつ迅速なため、1日に50点以上の分析が可能である。

なお、イオン電極法による NO_3^- -N の定量の際、抽出液中に塩素、重炭酸及び有機酸などが多量に存在する場合、それらが定量値に干渉するといわれている^{70,96)}。しかし、今回用いた材料においては、そのような現象は認められなかった。

このようにイオン電極法による牧草の硝酸塩の定量法は、正確性、簡便性、迅速性から判断して従来の方法よりすぐれているといえる。

以上のことから、以下における硝酸塩の定量法には、一部を除いてイオン電極法を採用することにした。

4. 要 約

牧草の硝酸塩分析法として、イオン電極法の応用を試み、次の結果を得た。

1. イオン電極法は、従来の方法に比べ、操作が極めて簡便であり、迅速に実施できる。
2. イオン電極法は、反復測定の変動係数 (0.7~3.8%) 及び回収率 (ほぼ 100%) から判断して従来法以上の精度を有する。
3. イオン電極法による硝酸塩の定量値は Morris らの方法によるそれとほぼ一致した。

第 2 節 サイレージ及び乾草調製における硝酸塩含量の変化

1. 緒 言

サイレージ調製によって、硝酸塩含量が減少することはよく知られている^{60,61,62,72,85,121,122)}。

しかるに、サイレージ及び乾草調製における硝酸塩含量の変化を端的に比較検討した報告はみられない。

本節では、硝酸塩含量を異にする種々の材料を用いてサイレージと乾草を調製し、硝酸塩含量の変化を比較した。また、サイレージ調製における硝酸塩含量の変化を水分含量との関連で検討する実験も行った⁴⁾。

2. 材 料 と 方 法

実験 1: 材料牧草には、北海道立新得畜産試験場の圃場で栽培された窒素施肥量及び刈取時期を異にするチモシーを用いた。窒素肥料は、低窒素区に 10 アール当り、3 kg N、高窒素区には 12 kg N をそれぞれ施用し、りん酸 8 kg、加里 6 kg は両区に同一とした。牧草の刈取りは、1969 年 6 月 18 日 (早刈) 及び 7 月 8 日 (遅刈) に実施し、同時に乾草及びサイレージを調製した。乾草は、モアで刈取り後、自然乾燥法により圃場で調製した。乾草調製に要した日数は、早刈 5 日間、遅刈 6 日間であった。サイレージは、ハーベスターで 2~3 cm に切断し、約 5 トンの材料牧草を無予乾でバキュームサイロに詰込み、密封後バキュームポンプで約 1/2 の高さになるまで排気した。

実験 2: 材料牧草及びサイレージは、第 1 章第 2 節の実験 3 と同様である。乾草は、モアで刈取り後、自然乾燥法により 2 日間で仕上げた。

実験 3: 材料牧草及びサイレージは、第 1 章第 2 節の実験 2 と同様である。

材料牧草、サイレージ及び乾草の硝酸塩はイオン電極法¹²⁾により定量した。

3. 結 果

実 験 1

刈取時期及び窒素施肥量を異にする材料牧草、サイレージ及び乾草の硝酸塩含量は

Table 36. Nitrate content of the materials, the silages and the hays (Exp. 1)

	N applied (kg/10 a)	NO ₃ -N (% of DM)		
		Material	Silage	Hay
Early cut	12	0.06 (100)	0.06 (100)	0.06 (100)
	3	0.05 (100)	0.06 (120)	0.07 (140)
Late cut	12	0.07 (100)	0.06 (80)	0.05 (71)
	3	0.05 (100)	0.06 (120)	0.05 (100)

Values in parentheses are % of material.

Table 36 に示した。

材料牧草の NO₃-N 含量は、乾物中 0.05～0.07% と低く、刈取時期及び窒素施肥量の影響は認められなかった。また、サイレージ及び乾草調製によって、硝酸塩含量はほとんど変化しなかった。

実験 2

窒素施肥量を異にするオーチャードグラス及びアルファルファから調製したサイレージ及び乾草の硝酸塩含量は Table 37 に示した。

Table 37. Nitrate content of the materials, the silages and the hays (Exp. 2)

	N applied (kg/10 a)	NO ₃ -N (% of DM)		
		Material	Silage	Hay
Alfalfa	10.0	0.17 (100)	0.07 (41)	0.15 (88)
	3.3	0.07 (100)	0.08 (114)	0.07 (100)
Orchardgrass	10.0	0.13 (100)	0.10 (77)	0.14 (108)
	3.3	0.10 (100)	0.08 (80)	0.07 (70)

Values in parentheses are % of material.

材料牧草の硝酸塩含量はいずれの草種においても窒素施肥量の増加によって高くなり、オーチャードグラス及びアルファルファの高窒素区において、それぞれ乾物中 0.13% 及び 0.17% となった。アルファルファの低窒素区の場合、材料牧草の NO₃-N 含量は乾物中 0.07% と低く、サイレージ調製によってほとんど変化しなかったが、アルファルファの高窒素区並びにオーチャードグラスの高窒素区及び低窒素区のサイレージの NO₃-N 含量は、それぞれ材料牧草の 41, 77 及び 80% に低下した。しかし、乾草調製では、両草種の低窒素区においてサイレージと同程度であったのを除いて、サイレージ調製の場合に比較

して硝酸塩含量の減少が少なかった。

実 験 3

水分含量及び窒素施肥量を異にする材料牧草とサイレージの硝酸塩含量は Table 38 に示した。

Table 38. Nitrate content of the materials and the silages (Exp. 3)

	N applied (kg/10 a)	NO ₃ -N (% DM)	
		Material	Silage
Fresh grass	12	0.24 (100)	0.07 (29)
	3	0.06 (100)	0.06 (100)
Wilted grass	12	0.24 (100)	0.07 (29)
	3	0.06 (100)	0.06 (100)

Values in parentheses are % of material.

材料牧草に硝酸塩含量の低かった低窒素区の場合、水分含量に関係になく、いずれもサイレージ調製によって硝酸塩含量の変化はみられなかったが、材料牧草に硝酸塩含量の高かった高窒素区では、サイレージ調製によって硝酸塩含量はいずれも著しく減少した。

4. 考 察

本実験において、材料牧草に硝酸塩含量が低かった場合、サイレージ及び乾草調製のいずれにおいても、硝酸塩含量の変化はみられなかった。しかし、材料牧草に硝酸塩含量が高かった場合、サイレージ調製によって、硝酸塩含量の著しい減少がみられたが、乾草のそれは少なかった。

このように、サイレージ調製における硝酸塩含量の変化は、材料牧草の硝酸塩含量によって異なるように思われたので、材料牧草の硝酸塩含量と調製中における消失量との関係を Fig. 12 に示した。この図によれば、材料牧草の硝酸塩含量と消失量との間には、 $r = 0.99$ ($P < 0.001$) の高い正の相関が認められ、両者の間には $Y = -0.06 + 0.943 X$ の回帰式が得られた。従って材料の硝酸塩含量が高くなるにつれて、硝酸塩の消失量が多くなることを示している。このような関係は宮崎・石田⁷²⁾の報告にもみられ、材料の硝酸塩含量と調製中に消失した量との間には $r = 0.90$ ($P < 0.001$) の有意な正の相関があったとしている。

サイレージ調製において、材料の硝酸塩は微生物や植物の酵素の作用によって、一酸化窒素、二酸化窒素、亜酸化窒素、窒素ガスなどのガス態で消失するので、サイレージ中の硝酸塩含量は材料のそれと比べ、かなり少ないことが報告されている^{60,61,62,72,85,121,122)}。

しかし、第2章第6節において、硝酸カリを添加して材料の硝酸塩含量を変えてサイレ

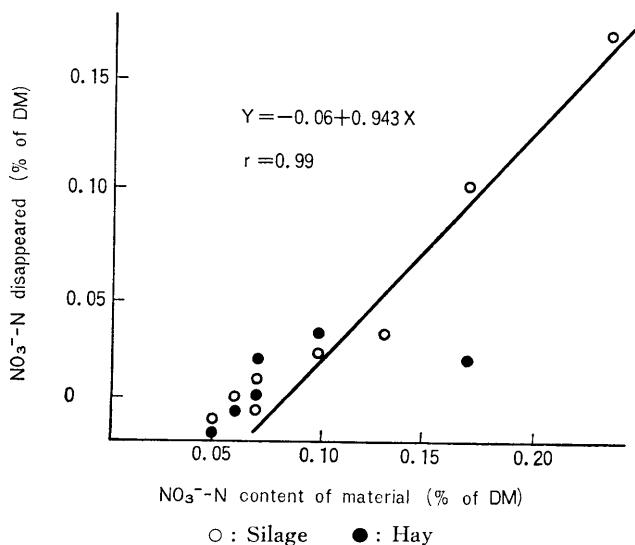


Fig. 12. Relationship between nitrate content of material and amount of the $\text{NO}_3\text{-N}$ disappeared during ensilage and hay making.

ージを調製した場合、材料の硝酸塩含量が高くなるにつれて、亜酸化窒素の生成量は増加したが、硝酸塩の消失量にはほとんど変化がみられず、消失率は低下することが認められた。後者については本実験の結果と異っている。このように、サイレージ調製において硝酸塩の消失の程度が異なることは、材料の違いによって、発酵の様相が異なったためと考えられる。

実験3では、サイレージ調製中における硝酸塩含量の変化が水分含量によってどのように影響されるかを検討したが、その影響はみられなかった。

以上のように、硝酸塩含量の高い牧草をサイレージにすると、その含量が著しく少なくなり、家畜にとって安全なものとなることが示唆された。

5. 要 約

牧草の硝酸塩含量が調製法の違いによってどのように変化するかを検討するため、刈取時期及び窒素施肥を異にするチモシーから調製した乾草とサイレージ (実験1)、窒素施肥量を異にするオーチャードグラス及びアルファルファから調製した乾草とサイレージ (実験2)、窒素施肥量及び水分含量を異にするオーチャードグラスから調製したサイレージ (実験3) について、それぞれの硝酸塩含量を調査した。

材料の硝酸塩含量が低かった場合には、乾草及びサイレージのいずれの調製においても、硝酸塩含量の変化は少なかった。一方、材料の硝酸塩含量が高った場合には、乾草で

は変化がなかったが、サイレージ調製によって著しく減少した。材料の水分含量は、サイレージ調製中の硝酸塩の消失の程度に影響しなかった。

材料の硝酸塩含量が高くなるにつれて、サイレージ調製中の硝酸塩の消失量が多くなり、両者の間に有意な正の相関 ($P<0.001$) が認められた。

以上のことから、硝酸塩含量の高い牧草は、サイレージ調製によってその含量が著しく減少するので、硝酸塩含量の高い牧草の利用方法として、サイレージは好ましい方法であると考えられた。

第 3 節 材料牧草の化学成分並びにサイレージ品質と硝酸塩消失量

1. 緒 言

前節において、硝酸塩含量の高い牧草は、サイレージ調製によって、その含量が著しく減少することを認めた。

サイレージ調製によって、材料の硝酸塩含量が減少するという報告は多いが、その減少の程度は異っている。この原因として、材料成分あるいはサイレージの品質の影響が考えられる。

そこで、本節では、第 2 章第 1 節で調製した 31 点のサイレージについて、材料牧草の成分及びサイレージの品質と調製中における硝酸塩の消失量との関係を統計的に解析した。

2. 材料と方法

材料牧草、サイレージ及び分析方法は、第 2 章第 1 節と同様である。

3. 結 果

材料成分及びサイレージ品質と調製中における硝酸塩の消失量との相関関係を調査し、その相関係数及び偏相関係数を Table 39 に示した。

単相関において、硝酸塩の消失量は、牧草の硝酸塩、粗蛋白質及び WSC 含量並びにサ

Table 39. Correlation between amount of disappeared nitrate during ensilage and chemical composition of grass ensiled and silage quality

	Grass (% DM)			Silage						
	NO ₃ -N	Crude protein	WSC	pH	Acids (% of fresh silage)				Flieg's mark	NH ₃ -N ^{a)}
					Lactic	Acetic	Butyric	Total		
Single	0.958***	0.604***	-0.648***	-0.121	0.260	0.805***	-0.598**	0.431**	0.467**	-0.197
Partial	0.971***	0.062	-0.590**	0.386*	0.216	-0.157	0.128	-0.130	-0.049	-0.072

a) % of total nitrogen.

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

イレージの酢酸、酪酸及び総酸含量並びにフリーク評点と有意な相関関係があった。しかし、偏相関では、硝酸塩の消失量は、牧草の硝酸塩及びWSC含量並びにサイレージのpHと有意な関係があった。

$\text{NO}_3\text{-N}$ の消失量(Y)と材料牧草の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量(X_1)、粗蛋白質含量(X_2)及びWSC含量(X_3)との間には、 $R=0.961$ の有意($P<0.001$)な重相関係数が得られ、 $Y=-0.050+0.906 X_1-0.0020 X_2-0.0028 X_3$ の重回帰式が求められた。

4. 考 察

相関関係の分析の結果、サイレージ調製中における硝酸塩の消失量は、材料の硝酸塩及び粗蛋白質含量が高くなるにつれて多くなり、WSC含量が高くなるにつれて少なくなることが示された。このうち、硝酸塩の消失量と材料の硝酸塩含量に有意な正の相関が認められたことは、前節及び宮崎・石田⁷²⁾の結果と一致する。

硝酸塩の消失量とサイレージ品質との関係では、酪酸含量及びフリーク評点においてそれぞれ有意な負及び正の相関が認められた。しかし、この結果は、サイレージの品質が悪くなるほど硝酸塩の消失量が多くなるという増子ら^{60,61,62)}及び内田ら^{121,122)}の報告とは一致しないが、偏相関の分析結果では硝酸塩の消失量とサイレージ品質との関係において、pHにのみ有意性が示された。このことは、本実験の結果が前述の報告と矛盾しないことを示唆している。

硝酸塩の消失量と材料牧草の硝酸塩、粗蛋白質及びWSC含量との間には、有意な重回帰式が求められた。しかし、粗蛋白質及びWSC含量の偏重回帰係数は有意でなかった。従って、重相関係数は $R=0.961$ と高ったが、硝酸塩の消失量と材料牧草の硝酸塩含量の間に得られた相関係数 $r=0.958$ とほとんど同じであった。このように、硝酸塩の消失量は材料牧草の硝酸塩含量と強い正の相関があることを認めたので、その関係をFig. 13に示す。 $\text{NO}_3\text{-N}$ の消失量(Y)と材料牧草の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量(X)の間は、 $Y=-0.10+0.90 X$ の有意な回帰式が得られた。

Fig. 13において、材料牧草の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中0.2%以上になると、 $\text{NO}_3\text{-N}$ の消失がみられた。この場合、第2章第1節で述べたように、サイレージはすべて酪酸のない良質のものであった。従って、サイレージ調製中に硝酸塩の消失がみられる場合には例外なしに酪酸のない良質のサイレージができるという注目すべき関係が認められた。

サイレージ調製中の硝酸塩含量の低下は、材料の硝酸塩が微生物や植物の酵素の作用により、一酸化窒素、亜酸化窒素、窒素ガスなど、ガス状でとり除かれるためだといわれている^{71,79,126)}。第2章第6節においても、材料の硝酸塩含量が高くなると N_2O の生成量が多くなることを認めている。従って、硝酸塩含量の高い材料を用いてサイレージを調製した

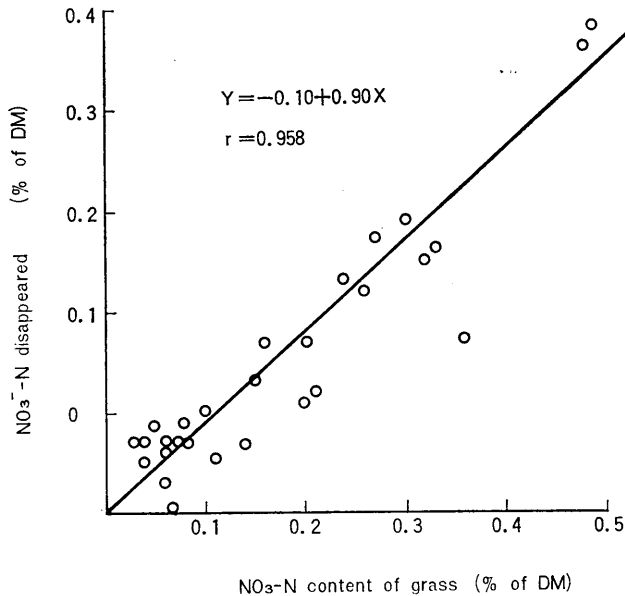


Fig. 13. Relationship between nitrate content of grass ensiled and amount of nitrate disappeared during ensilage.

場合、例外なしに良質サイレージができるのは、一酸化窒素、亜酸化窒素などが不良菌の増殖を抑制するためと考えられる。

サイレージ中の硝酸塩の残存量は、家畜の硝酸中毒との関連から重要である。硝酸中毒の限界量は、一般に $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量で風乾物中 0.2% 以上とされている⁷⁵⁾。材料牧草には、この限界量を上回ったものが 12 点あったが、サイレージではわずか 1 点のみであった。このように、硝酸塩含量の高い牧草の利用法として、サイレージの有利性が理解される。

5. 要 約

第 2 章第 1 節で調製した 31 点のサイレージについて、材料の成分及びサイレージ品質と調製中における硝酸塩の消失量との関係を統計学的に解析した。

硝酸塩の消失量は、材料牧草の硝酸塩及び粗蛋白質含量並びにサイレージの酢酸含量、総酸含量及びフリーク評点とは有意な正の相関が、材料牧草の WSC 含量及びサイレージの酪酸含量とは有意な負の相関があった。また、硝酸塩の消失量と材料牧草の硝酸塩含量並びにサイレージの pH とは、正の有意な偏相関が、また、硝酸塩の消失量と WSC 含量との間に有意な負の偏相関が認められた。

$\text{NO}_3\text{-N}$ の消失量 (Y) と材料牧草の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量 (X_1)、粗蛋白質含量 (X_2)、WSC 含量 (X_3) の間には有意な重相関係数が得られ $Y = -0.050 + 0.906 X_1 - 0.002 X_2 - 0.0028 X_3$ の回帰式が求められた。

調製中に硝酸塩の消失がある場合には、常に酪酸のない良質のサイレージが得られることを知った。

第4節 サイレージ品質並びに硝酸塩含量に及ぼす密封時期、 温度並びに水分含量の影響

1. 緒 言

前節において、サイレージ調製中における硝酸塩の消失量は、材料の硝酸塩含量と密接な関係があり、硝酸塩含量が高くなるほど多くなることを認めた。また硝酸塩の消失量とサイレージ品質との関係では、pH との間に有意な正の偏相関が認められ、pH が高くなるほど硝酸塩の消失量が多くなることが示された。

そこで、このことをさらに検討するために、エンバクを用い、密封時期、温度及び水分含量を変えて品質の異なるサイレージを調製し、サイレージ品質と硝酸塩含量との関係を解析した。

2. 材料と方法

材料には、西那須野町の農家で栽培された出穂期のエンバク（品種：ハヤテ）を用いた。10 アール当りの施肥量は、窒素、りん酸及び加里がそれぞれ 11.2 kg であった。

エンバクは、1979 年 11 月 17 日に刈取り、カッターで 1 cm に切断して、500 ml の広口瓶に詰込んだ。

詰込時の化学組成は Table 40 に示した。

Table 40. Chemical composition of materials ensiled

Level of Moisture	Moisture (%)	Crude protein —————	WSC (% of DM) —————	NO ₃ ⁻ -N
High	86.5	14.6	15.2	0.09
Medium	79.1	15.3	12.5	0.08
Low	69.3	14.8	12.0	0.07

サイレージの調製条件は次の如くである。まず、水分含量を3段階に調節するため、そのまま及び重量が1/1.5並びに1/2になるまで60°Cの乾燥機で乾燥し、それぞれ無予乾、軽予乾及び強予乾の3区を設け、その各区に対して、直ちに密封する区（早期密封区）と詰込後1日経過してから密封する区（密封遅延区）を設け、それらを15°C（低温区）及び30°C（高温区）の恒温室に貯蔵した。従って、設計は3×3×2要因実験により、12種類のサイレージを調製した。なお、サイレージは各処理当り、2反復で調製し、50日間経過した後、開封し分析に供した。

材料の水分、粗蛋白質及びWSCは第1章第1節と同様の方法により、材料及びサイレージの硝酸塩並びにサイレージの品質は第2章第6節と同様にそれぞれ測定した。

統計的方法は吉田の方法¹³⁵⁾によって実施した。

Table 41. Quality and nitrate content of the silages

Time of sealing	Temperature (°C)	Level of moisture	pH	Acids (% of fresh silage)									Flieg's mark	NH ₃ -N ^{a)}	NO ₃ -N (mg % DM)
				Lact.	C ₂	C ₃	i-C ₄	n-C ₄	i-C ₅	n-C ₅	n-C ₆	Total			
Early	15	High	3.91	2.94	0.22	0	0	0	0	0	0	3.16	100	7.4	22.3
		Medium	4.19	3.35	0.29	0	0	0	0	0	0	3.64	100	7.4	5.7
		Low	4.28	4.46	0.54	0	0	0	0	0	0	5.16	100	7.1	6.3
	30	High	3.98	2.46	0.28	0	0	tr.	0	0	0	2.74	100	8.7	7.6
		Medium	4.28	2.71	0.34	0	0	0	0	0	0	3.05	100	9.9	6.1
		Low	4.32	3.79	0.50	0	0	tr.	0	0	0.01	4.30	100	8.0	4.7
Late	15	High	4.27	1.93	0.36	0	0	0	0	0	0	2.29	100	10.4	5.9
		Medium	5.97	0.27	0.66	0.30	0.15	0.54	0.04	0	0.04	2.00	-5	27.0	3.1
		Low	5.70	0.81	0.97	0.46	0.17	0.19	tr.	0	0	2.60	10	18.8	3.3
	30	High	5.44	0.26	0.22	0.09	0.07	0.80	0.07	0.07	0.21	1.79	9	17.5	0.7
		Medium	5.79	0.24	0.88	0.37	0.21	0.97	0.10	0.05	0.25	3.07	-7	42.3	0.7
		Low	5.95	0.39	1.05	0.63	0.36	0.92	0.06	0	tr.	3.41	-5	29.6	1.7

a) % of total nitrogen.

C₂: Acetic acid, C₃: Propionic acid, C₄: Butyric acid, C₅: Valeric acid, C₆: Caproic acid.

Table 42. Analysis of variance for quality of the silage

Factor	f	pH	Acids (% of fresh silage)									Flieg's mark	NH ₃ -N ^{a)}	NO ₃ -N (mg % DM)
			Lact.	C ₂	C ₃	i-C ₄	n-C ₄	i-C ₅	n-C ₅	n-C ₆	Total			
Time of sealing (S)	1	11.12	41.19	0.65	0.56	0.152	1.92	0.011	0.002	0.04	0.75	41085	2020	231
Temperature (T)	1	0.35	2.87	0.01	0.02	0.017	0.64	0.005	0.002	0.03	0.10	1683	427	105
Wilting (W)	2	1.16	1.24	0.49	0.12	0.027	0.12	0.002	0.001	0.01	4.23	4178	186	71
T × S	1	0.18	0.22	0.001	0.01	0.016	0.64	0.006	0.002	0.03	1.98	1683	286	7
T × W	2	0.24	0.50	0.02	0.001	0.003	0.02	0.001	0.001	0.01	0.37	2505	17	50
S × W	2	0.31	2.29	0.13	0.12	0.027	0.06	0.001	0.001	0.01	0.57	4178	147	45
T × S × W	2	0.24	0.24	0.02	0.001	0.003	0.02	0.001	0.002	0.01	0.37	2507	14	21
Error	12	0.002	0.03	0.004	0.0003	0.0001	0.001	0.00005	0.00001	0.00003	0.04	32	0.7	7

a) % of total nitrogen.

C₂, C₃, i-C₄, n-C₄, i-C₅, n-C₅, n-C₆: Same as in Table 41.

3. 結 果

サイレージの品質及び硝酸塩含量並びにその分散分析表はそれぞれ Table 41 及び Table 42 に示した。

早期密封した場合、サイレージの品質は温度及び水分含量に関係なく良質であった。しかし、密封遅延の場合には、低温の無予乾区を除いて著しく品質の悪いサイレージができた。密封遅延の影響を水分含量及び温度との関係でみると、低温では、無予乾の場合のみ良質のサイレージができたが、軽予乾及び強予乾のサイレージは著しく品質が悪かった。一方、高温では、水分含量に関係なくすべて品質の著しく悪いサイレージができた。

分散分析の結果、サイレージ品質は密封時期、温度及び水分含量によっていずれも有意な影響をうけることが認められた。即ち、密封遅延及び高温条件によってサイレージ品質が悪くなり、水分含量の影響では、無予乾のものが最もよく、軽予乾は最も悪く、強予乾はその中間であった。これらの要因の中で、密封時期の影響が最も大きく、温度と水分含量の影響は同程度であることが認められた。また、これらの3要因は相互に関連し、多くの場合これら2要因及び3要因の交互作用は有意であった。

サイレージの硝酸塩含量は、材料に比較してすべて著しく低い値になった。品質の良かったサイレージ、即ち、早期密封のすべてのサイレージ及び密封遅延では低温で無予乾のサイレージの $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量は乾物中 $4.7\sim 22.3\text{ mg \%}$ と高く、なかでも早期密封—低温—無予乾のサイレージは 22.3 mg \% ととび抜けて高かった。一方、密封遅延で高温条件のため品質が著しく悪くなったサイレージの $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量は乾物中 $0.7\sim 1.7\text{ mg \%}$ と著しく低かった。また、密封遅延で低温条件の軽予乾及び強予乾の品質が比較的悪かったサイレージの $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量は乾物中 $3.1\sim 3.3\text{ mg \%}$ と前2者のほぼ中間的な値を示した。

分散分析の結果、サイレージの硝酸塩含量は、密封遅延 ($P<0.001$)、高温 ($P<0.01$) 及び予乾 ($P<0.01$) によって有意に低下することが認められた。また、硝酸塩含量に対する温度と予乾 ($P<0.01$) 及び密封時期と予乾 ($P<0.05$) の交互作用も有意であった。

4. 考 察

1930年代にアメリカ合衆国西部諸州の放牧地帯で硝酸塩含量の高いエンバク乾草を摂取した反芻家畜が Oat hay poisoning (硝酸中毒) を起こし、問題になったことは有名である¹³⁴⁾。本実験で用いたエンバクの $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量は乾物中 0.08% であり、硝酸中毒を起こすと考えられている量 (風乾物中 0.2%) より少なかった。

本実験では、サイレージの品質と硝酸塩含量の関係を知るために、密封時期、温度及び水分含量を変えてサイレージを調製した。予想したように、サイレージの品質はこれらの要因によって著しく影響されることが認められた。中でも密封時期の影響は最も大きく、

密封遅延によってサイレージ品質が悪くなることが示された。このような密封遅延の悪影響は、Henderson ら³⁹⁾、Donaldson ら²⁷⁾ 及び高野ら¹¹⁵⁾ によっても報告されている。

本来、サイレージは嫌氣的条件で乳酸発酵を利用して不良発酵を抑制し、貯蔵性を高めたものである。従って、密封遅延は、好氣的条件を持続させ、好氣性微生物の増殖を活発にするため、乳酸菌の増殖が抑制され、最終的には酪酸菌が支配的となり、品質の悪いサイレージができると考えられる。ちなみに、大山ら⁹¹⁾ は埋蔵初期に空気を導入すると例外なく品質劣質化することを認めている。

しかし、密封時期の影響は温度及び水分含量と関係し、密封遅延の場合、低温では無予乾のときのみ良質サイレージができたが、高温では水分含量に関係なく、すべて品質が悪くなることを認めた。従って、サイレージの品質に及ぼす密封遅延と高温の悪影響の相乗効果が示された。高野ら¹¹⁵⁾ も密封遅延の悪影響は高温で顕著であったと報告している。

高温の悪影響については、すでに第2章第4節及び他の報告^{95,132)} において認められており、本実験の結果はこれと一致している。

一般に水分含量が低くなると、不良発酵が抑制されて品質が改善されることが知られている^{131,137)}。本実験において、水分含量の影響では、無予乾が最も良く、軽予乾が最も悪く、強予乾は前2者の中間であった。この理由には次のことが考えられる。即ち、軽予乾は、水分含量が79.1%とまだかなり高く、WSC含量が予乾の過程で15.2%から12.5%へ減少したため、無予乾の場合より条件が悪くなり、強予乾では、軽予乾と同様にWSC含量が12.0%と低くなったが、水分含量が69.3%とほぼ理想的な値となったため、サイレージの品質は、無予乾>強予乾>軽予乾の順になったと考えられる。一方、予乾の過程で硝酸塩含量のわずかな低下がみられた。従って、この予乾過程における硝酸塩含量の減少がサイレージの品質に影響を及ぼした可能性も考えられる。

サイレージのpHと硝酸塩含量の相関関係を調査したところ、両者の間には $r = -0.652$ の有意($P < 0.05$)な相関が認められた。

以上のことから、サイレージ調製中における硝酸塩含量の変化は、pHと密接な関係があることを確認した。サイレージ調製における硝酸塩の消失は微生物や植物内の酵素の作用によるとされているので、この点については次節で検討することにした。

5. 要 約

エンバクを用いて、密封時期、温度及び水分含量を変えてサイレージを調製し、その品質と硝酸塩含量との関係を検討した。

サイレージの品質は、密封遅延、高温及び予乾によって低下したが、その中で密封遅延の影響が著しかった。

サイレージの硝酸塩含量と pH の間には、 $r = -0.652$ ($P < 0.05$) の有意な相関係数が求められ、pH が高くなるほど、硝酸塩含量が低くなることが示された。

第5節 微生物の動態と硝酸塩の消長

1. 緒言

これまでに、硝酸塩含量の高い材料を用いてサイレージを調製すると、硝酸塩含量は調製中に減少し、その減少の程度は、pH が高く、品質の悪いもののほど大きいことを明らかにした。

本節では、この機序を知るために、詰込時に乳酸菌を添加したサイレージと添加しないサイレージを調製し、サイレージの発酵経過並びに微生物の動態と硝酸塩並びに亜硝酸塩の消長との関係を調べた。

2. 材料と方法

材料牧草には、酪農学園大学試験圃場で栽培されたオーチャードグラス（品種：キタミドリ）の1番草を用いた。牧草の生育時期は出穂期で、その化学組成は、水分 80.0%、乾物中粗蛋白質 19.4%、WSC 7.1% 及び $\text{NO}_3\text{-N}$ 0.20% であった。なお、10 アール当りの施肥量は、窒素、りん酸及び加里でそれぞれ 20、10 及び 20 kg であった。

牧草は刈取り後、直ちにカッターで 2~3 cm に切断し、対照区においては、無添加で、乳酸菌添加区では、良質サイレージから分離した乳酸菌 (*Lactobacillus plantarum*) を材料 1 g 当り 10^6 になるように添加し、それぞれ 1 ℓ 容ポリ瓶に密に詰込んだ。サイロは室内に放置し、詰込後 2、4、7、14 及び 50 日目に開封し分析に供した。

水分、粗蛋白質、WSC 及び硝酸塩並びにサイレージ品質は第1章第1節と同様に、サイレージ品質は第2章第2節と同様に、亜硝酸塩 ($\text{NO}_2\text{-N}$) はザルツマン法¹⁾によりそれぞれ測定した。

3. 結果

硝酸塩及び亜硝酸塩含量の消長は Fig. 14 に示した。

$\text{NO}_3\text{-N}$ 含量は、いずれも 2 日目に急激に低下し、その後は、対照区において 4 日間にわずかな増加がみられた以外、ほとんど変化しなかった。また、調製中における $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量の低下は対照区の方が大きかった。 $\text{NO}_2\text{-N}$ 含量は、いずれも、2 日間で最高となり、対照区が高かったが、以後消失した。

サイレージの微生物相の動態は Fig. 15 に示した。

乳酸菌数は、乳酸菌添加区では 2 日間で 1 g 当り 1.4×10^9 と著しい増加がみられたが、対照区ではそれより少なく、4 日間で 7.9×10^8 と最高となった。好気性細菌数は、埋蔵初

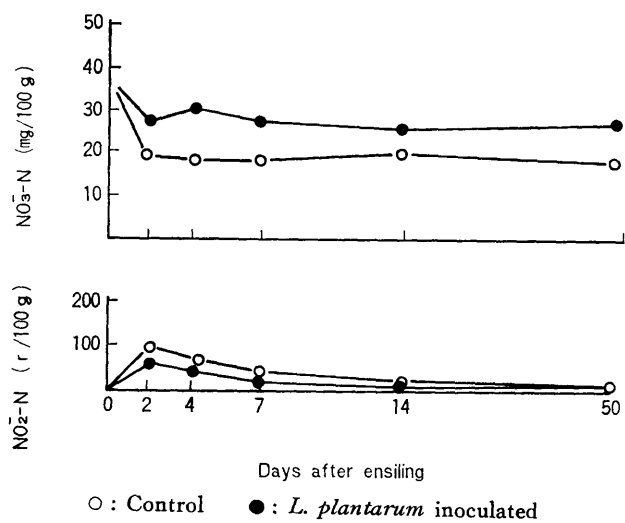


Fig. 14. Changes in the concentration of $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$ during ensilage.

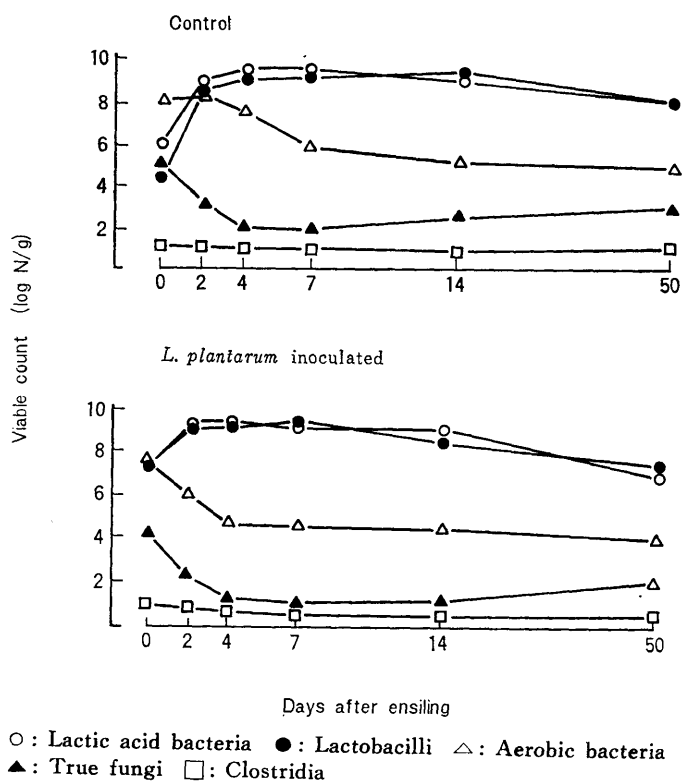


Fig. 15. Changes in microbial count during ensilage.

Table 43. Effect of *Lactobacillus plantarum* on the process of silage fermentation

	Days after ensiling	pH	(% of fresh silage)				NH ₃ -N ^{a)}
			Lactic	Acetic	Butyric	Total	
Control	2	4.62	1.35	0.23	0	1.58	3.9
	4	4.72	1.45	0.29	0	1.74	4.5
	7	4.31	1.78	0.30	0	2.08	4.8
	14	4.34	2.01	0.26	0	2.27	5.8
	50	4.10	2.32	0.59	0	2.91	7.6
<i>L. plantarum</i> inoculated	2	4.25	1.61	0.24	0	1.85	3.2
	4	4.10	1.84	0.23	0	2.07	3.7
	7	4.02	2.07	0.26	0	2.33	4.2
	14	4.00	2.19	0.34	0	2.53	4.3
	50	3.98	2.28	0.31	0	2.59	5.2

a) % of total nitrogen.

期に対照区で一時的に増殖が認められたが、その増殖は乳酸菌添加によって著しく抑制された。酪酸菌数は両区に終始みられず、真菌類数の変化にも両区に差はなかった。

サイレージ品質の経時的変化は Table 43 に示した。

乳酸菌添加によって、急速な乳酸含量の増加と pH の低下がみられ、アンモニアの生成が抑制された。また、両区に酪酸は終始認められなかった。この結果、サイレージはいずれも良質であったが、乳酸菌添加によってさらに品質が改善されることが認められた。

4. 考 察

サイレージ調製における硝酸塩含量の減少は、いずれの区も埋蔵後 2 日目にみられ、その後の変化はほとんどなかった。このような変化は、第 2 章第 6 節においてすでに認められている。また、増子ら⁶¹⁾は、サイレージ調製中における硝酸塩の消失は、程度に差はあるが、埋蔵後 3 日後にみられたと報告している。なお、その実験では、3 日目以前における硝酸塩含量を測定していない。従って、サイレージ調製における硝酸塩含量の減少は、埋蔵のごく初期に起こると考えられる。

一方、硝酸塩含量の減少に対応して亜硝酸塩含量の増加がみられ、NO₃⁻ から NO₂⁻ への還元が示唆された。しかし、生成した NO₃⁻-N 含量は消失した NO₃⁻-N 含量に比較して著しく少なかった。サイレージ調製における硝酸塩含量の低下は、酸化窒素、窒素ガス等のガス状で消失するためとされているが、本実験ではこれらの測定を行わなかった。

硝酸塩含量の低下は、乳酸菌添加によって著しく抑制された。また、乳酸菌を添加すると、乳酸生成が活発となり、初期の pH 低下が促進された。このように、硝酸塩含量の低

下は pH が低くなると抑制されることが示され、これはこれまでの結果と一致する。

乳酸菌添加によって、埋蔵初期の好気性細菌数が著しく減少することを認めた。大山ら⁹⁵⁾は、乳酸菌を添加すると、埋蔵初期のグラム陰性菌の増殖が著しく抑制されたことを報告しており、本実験の結果と類似している。

本実験において、硝酸塩含量の低下の時期及びその程度は、好気性細菌の増殖の時期及びその程度とよく同調した。好気性細菌の多くは、硝酸塩を還元する性質をもっている¹³⁶⁾。従って、本実験の場合、サイレージ調製中における硝酸塩含量の低下は、好気性細菌の還元作用によるものと考えられる。

一方、好気性細菌の増殖が持続すると、乳酸発酵が抑制され、その後酪酸発酵が支配的となり、品質の悪いサイレージができることが知られている⁹⁵⁾。しかし、酪酸菌のなかには硝酸塩を還元するものがある^{35,53)}。このようなことから、前節で示したように、品質の悪いサイレージでは、硝酸塩含量が著しく低くなることが理解できるが、サイレージ調製における硝酸塩の詳細な還元経路についてはまだ知られていない。この点については次節で検討することにした。

5. 要 約

サイレージ調製によって硝酸塩含量が低下することを認めたので、その機序を知るため、乳酸菌添加及び無添加のサイレージを調製し、硝酸塩含量、微生物相及びサイレージ品質の変化を経時的に調べた。

硝酸塩含量は、埋蔵後 2 日目まで急速に低下し、その後の変化はほとんどなかった。硝酸塩含量の低下は乳酸菌添加によって抑制された。乳酸菌添加によって、初期の乳酸菌数が著しく増加し、好気性細菌の増殖が抑制されることが認められた。サイレージの品質では、乳酸菌添加によって、乳酸含量が増加し、pH の低下が促進された。

このように、硝酸塩含量の低下の時期及びその程度は、好気性細菌の増殖の時期及びその程度とよく同調した。このことから、サイレージ調製における硝酸塩含量の減少は、好気性細菌による硝酸還元作用であると推察された。

第 6 節 サイレージ品質と ¹⁵N-硝酸塩の還元

1. 緒 言

前節において、サイレージ調製中における硝酸塩含量の減少は、埋蔵のごく初期に起こり、それは好気性細菌の硝酸還元作用であることを示唆した。

しかしながら、サイレージの発酵過程における硝酸塩の還元経路についてはまだ知られていない。よって、本節ではこのことを明らかにするため ¹⁵N で標識した硝酸カリを添加

してサイレージを調製し、硝酸塩の還元経路を経時的に追跡するとともに、これが品質とどのように関係があるかを検討した¹⁹⁾。

2. 材料と方法

材料牧草には、農林水産省草地試験場の圃場で生育中のオーチャードグラス（品種：アオナミ）の4番草を用いた。牧草の化学組成は、水分81.8%、乾物中粗蛋白質17.0%、WSC 7.4%及び NO_3^- -N 0.12%であった。牧草は1979年11月12日に刈取り、直ちにカッターで0.5 cmに切断し、これに ^{15}N -硝酸カリ（96 atom %，光興業）を0.05%添加混合し、実験用サイロに詰込んだ。対照区においては、詰込後直ちに密封を行い、密封遅延区は詰込後24時間経過してから密封した。グルコース添加区は、詰込前にグルコースを2%添加した以外対照区と同様に行った。

実験用サイロは第2章第6節と同様である。サイロは30°Cの恒温室に放置し、詰込後1, 2, 4, 7及び30日目に、各区3基のサイロを開封し、分析に供した。

材料牧草及びサイレージの成分並びにサイレージ品質の分析は第2章第6節と同様に行った。 ^{15}N は、 NO_3^- 、 NO 、 N_2O 及び NH_3 画分をデバルダ法^{26,27)}によりアンモニアに還元し、これを4%硼酸溶液に捕集、濃縮後、減圧下のリッテンベルグ管内で臭化カリによって窒素ガスを単離し、高真空の放電管に導いて封入した後、NIA-1型N-15アナライザー（日本分光工業製）によって測定した⁵²⁾。

3. 結 果

pH及び乳酸含量の変化はFig. 16に示した。

pHは、対照区及びグルコース添加区において、急速に低下し、1日目でそれぞれ4.6及び4.4となり、前者ではその後変化がみられなかったが、後者では7日目に3.8になるまでさらに低下した。一方、密封遅延区では大きな変化がみられなかった。乳酸含量は、対照区及びグルコース添加区において、2日目まで急速に、そしてその後は徐々に増加し、30日目ではそれぞれ2.10%及び3.34%となった。一方、密封遅延区の乳酸生成量は極めて少なく、30日目で0.24%であった。

30日目におけるサイレージの品質はTable 44に示した。

対照区のサイレージは、乳酸含量が高く、酪酸及び

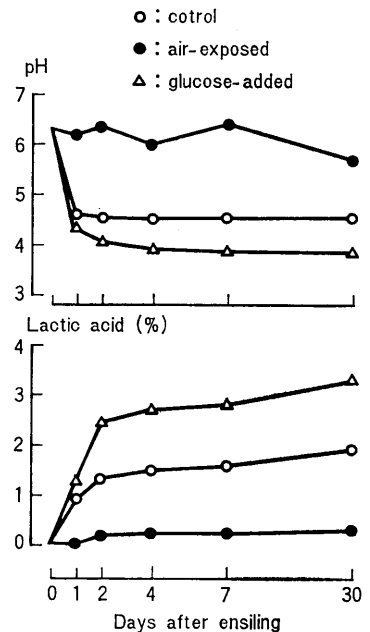


Fig. 16. Changes in pH and lactic acid content during ensilage.

Table 44. Quality of the silages at the 30th day

	pH	Acids (% of fresh silage)						Total	Flieg's $\text{NH}_3\text{-N}^a)$ mark	
		Lact.	Acet.	Prop.	But.	Val.	Cap.			
Control	4.45	1.92	0.51	tr.	tr.	tr.	0.02	2.45	97	11.0
Air-exposed	5.63	0.24	0.96	0.25	1.12	0.22	0.29	3.08	-6	46.4
Glucose-added	3.85	3.34	0.12	0.01	0	0	0	3.47	100	4.2

a) % of total nitrogen.

高級 VFA 並びに $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率が低く、良質であった。グルコース添加区では、対照区よりさらに乳酸含量が高くなり、pH の低い酪酸及び高級 VFA のない、 $\text{NH}_3\text{-N}$ の著しく低い、最も良質のサイレージができた。一方、密封遅延区のサイレージは極めて品質の悪いサイレージができた。

サイレージ調製中における $\text{NO}_3\text{-}^{15}\text{N}$ 、 $\text{NO-}^{15}\text{N}$ 及び $\text{NH}_3\text{-}^{15}\text{N}$ の変化は Fig. 17 に示した。

$\text{NO}_3\text{-}^{15}\text{N}$ 含量は、詰込後 1~2 日で急速に減少し、密封遅延区、対照区及びグルコース添加区でそれぞれ詰込時の 0.3%、0.5% 及び 17.1% となった。 $\text{NO-}^{15}\text{N}$ の生成は、対照区及びグルコース添加区においてそれぞれ 1 日目 (1.3%) 及び 2 日目 (4.0%) に最高値となったがいずれも 4 日目以後みられなくなった。

一方、密封遅延区では $\text{NO-}^{15}\text{N}$ の生成はほとんどなかった。 $\text{NH}_3\text{-}^{15}\text{N}$ 含量は、いずれも 2 日目まで急速に増加し、その後は徐々に増加し、30 日目では、密封遅延区、対照区及びグルコース添加区においてそれぞれ全 ^{15}N の 97.7、71.5 及び 38.5% となった。 $\text{NO}_2\text{-N}$ はすべてのサンプルに検出されなかった。

$\text{NO}_3\text{-N}$ 、 $\text{NO-}^{15}\text{N}$ 及び $\text{NH}_3\text{-}^{15}\text{N}$ 含量と pH との関係は Fig. 18 に示した。

pH と $\text{NO}_3\text{-}^{15}\text{N}$ 含量及び $\text{NO-}^{15}\text{N}$ 含量の間には有意な負の相関が、pH と $\text{NH}_3\text{-}^{15}\text{N}$ 含量との間には有意な正の相関がそれぞれ認められた。

4. 考 察

サイレージの発酵は、化学的要因、物理的要因及び微生物的要因によって大きく左右さ

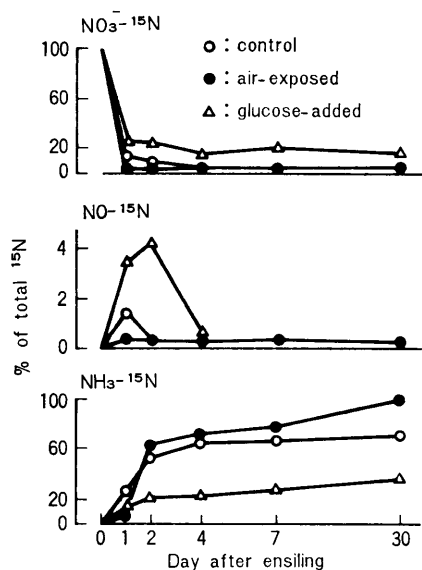


Fig. 17. Changes in the amount of $\text{NO}_3\text{-}^{15}\text{N}$, $\text{NO-}^{15}\text{N}$ and $\text{NH}_3\text{-}^{15}\text{N}$ during ensilage.

れる。中でもサイロ内の嫌気的条件と材料の糖含量が重要であるとされている⁹⁵⁾。即ち、埋蔵初期に好気的条件下にすると、サイレージの品質は確実に悪くなることが認められており⁹¹⁾、本章第4節においても、高温条件下での密封遅延によってサイレージの品質が著しく悪くなったことを認めている。一方、グルコース添加によって品質が著しく改善されることが知られている。従って、本実験では、品質の異なるサイレージを作るため、詰込後直ちに密封する対照区、24時間密封を遅延する区及びグルコースを添加する区を設けた。なお、密封遅延の効果を最大限にするため、埋蔵温度をすべて30°Cに設定した。予想した通り、密封遅延区のサイレージは著しく品質の悪いものができ、グルコース添加区では最も良質なものができた。一方、対照区では、材料が高蛋白質、低WSC含量で、埋蔵温度が高温という不良条件であったにもかかわらず、良質のサイレージができた。これは材料の NO_3^- -N含量が乾物中0.12%と比較的高かったことから、材料のWSC含量が低く、高温条件下であっても、 NO_3^- -N含量が高ければ良質のサイレージが得られるというこれまでの知見と一致する。

前節において、硝酸塩含量の減少は詰込後急速に起こり、これは好気性細菌の還元作用であると推察した。また、その硝酸塩含量の減少は急速な乳酸菌の増殖によるpHの低下によって抑制されることを認めている。本実験において、 NO_3^- - ^{15}N 含量の減少は詰込後1~2日で起こり、その程度は密封遅延区>対照区>グルコース添加区の順となり、サイレージのpHの高いものほど大きいことが認められ (Fig. 18), これまでの結果を支持している。

サイレージの発酵過程における一酸化窒素生成についての報告は若干みられるが^{97,126)}、これに及ぼす要因についてはほとんど知られていない。本実験において、 NO - ^{15}N の生成は、詰込後1~2日目で見られ、生成量は、pHの低い良質サイレージほど多かった (Fig. 18)。また、 NO - ^{15}N は4日目以後急速に消失した。なお、本実験で用いた定量法 (デバルダ法) では NO_2^- - ^{15}N は検出できなかった。一酸化窒素の生成機序は次のように考えられる。

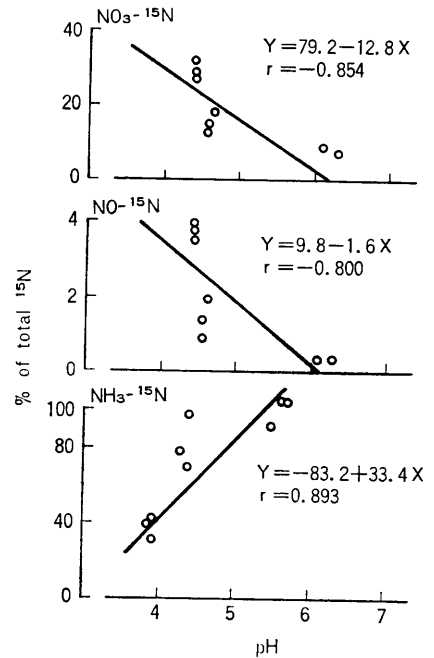
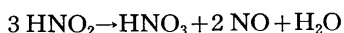
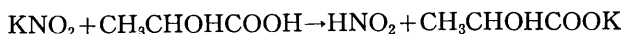


Fig. 18. Correlation between pH and the concentration of NO_3^- - ^{15}N , NO - ^{15}N and NH_3 - ^{15}N in the silage.



即ち、まず硝酸塩は微生物の作用により、亜硝酸塩に還元される。次いで亜硝酸塩は、乳酸発酵で生じた乳酸と反応して遊離の亜硝酸となり、さらにそれから一酸化窒素が生じる。さらに一酸化窒素は還元されて亜酸化窒素になることは第3章第6節ですでに述べた。従って、一酸化窒素が生成されるためには乳酸が生成されていることが前提となる。

細菌による硝酸塩の還元経路は2種類あるとされている⁹⁸⁾。一つは、前述の如く硝酸塩が亜硝酸を経て、一酸化窒素、亜酸化窒素あるいは窒素ガスにまで還元される異化型代謝経路であり、もう一つは亜硝酸を経てアンモニアまで還元される同化型代謝経路である。

これまでサイレージ調製による硝酸塩含量の減少は、一酸化窒素、亜酸化窒素、窒素ガスなどがガス状で消失するためと考えられていた^{70,97,126)}。しかし、 $\text{NO}-^{15}\text{N}$ の生成量は、詰込時の $\text{NO}_3^{-}-^{15}\text{N}$ の4%以下と著しく少なかった。

サイレージ発酵において、硝酸塩からアンモニアまでの還元経路を証明した報告はこれまでみられない。本実験において、 $\text{NO}_3^{-}-^{15}\text{N}$ から $\text{NH}_3-^{15}\text{N}$ への還元が認められた。即ち、硝酸塩から、アンモニアへの還元は、2日目まで急速に起こり、その後も緩慢に続いた。さらに、その還元の程度は、密封遅延区>対照区>グルコース添加区の順であり、pHが高く、品質の悪いものほど大きいことが知られた。

以上の如く、サイレージ品質と硝酸塩の還元の程度及びその経路には密接な関係が認められ、品質が悪い場合、硝酸塩が還元される量は著しく多くなり、その経路は同化型であるのに対して、品質が良い場合、還元される硝酸塩が少なくなり、その経路は、同化型と異化型であった。サイレージ調製における硝酸塩の還元の様相は、pHによって決定されたと考えられた。

5. 要 約

^{15}N で標識した硝酸塩を添加して、対照区、密封遅延区及びグルコース添加区の3種類のサイレージを調製し、 ^{15}N -硝酸塩の還元の様相と品質の変化を経時的に調査した。

対照区及びグルコース添加区において、急速なpHの低下と乳酸生成がみられ、それは特に後者の方で著しかった。しかし、密封遅延区ではこれらの変化はなかった。グルコースの添加はサイレージの品質を改善し、密封遅延は、品質劣化をもたらした。

$\text{NO}_3^{-}-^{15}\text{N}$ 含量は2日目で急速に減少し、密封遅延区、対照区及びグルコース添加区において、それぞれ詰込時の0.3、0.5及び17.1%になった。ごく少量の $\text{NO}-^{15}\text{N}$ の生成が、対照区及びグルコース添加区でみられ、それは後者で多かったが、いずれも4日目以後消失

した。密封遅延区では、 NO^{-15}N の生成はほとんどなかった。サイレージの発酵過程で $\text{NO}_3^{-15}\text{N}$ から $\text{NH}_3^{-15}\text{N}$ への還元が認められ、30 日目における $\text{NH}_3^{-15}\text{N}$ の含量は、密封遅延区、対照区及びグルコース添加区において、それぞれ添加した $\text{NO}_3^{-15}\text{N}$ の 97.7, 71.5 及び 38.5% であった。

サイレージの発酵過程における硝酸塩の還元の様相は pH によって決定されと考えられた。

第7節 材料の硝酸塩含量とサイレージ品質並びに ^{15}N -硝酸塩の還元

1. 緒 言

これまでに、硝酸塩がサイレージの発酵を改善することを示唆し、さらにこれを種々の条件下で実証してきた。

一方、硝酸塩含量は調製中に減少することを認め、それは好気性細菌の硝酸還元作用によるものであると推測された。さらに、硝酸塩の還元の程度及びその様相は、サイレージの品質特に pH と密接な関係があることを認めた。

このようなことから、硝酸塩がサイレージ発酵に及ぼす影響は、発酵過程における硝酸塩の還元現象と関係があるように考えられる。

本節では、硝酸塩がサイレージの発酵を改善する機序を明らかにするため、 ^{15}N で標識した硝酸カリを3段階で添加してサイレージを調製し、その発酵経過並びに ^{15}N -硝酸カリの還元の様相を調べた¹⁴⁾。

2. 材料と方法

材料牧草、サイロ、埋蔵温度及びサイレージは第2章第6節と同様である。

^{15}N で標識した硝酸カリの添加は次のように行った。0.05% 区においては、95 atom % の ^{15}N -硝酸カリを材料牧草に対して 0.05% 添加し、0.2% 及び 0.4% においては、10 atom % の ^{15}N -硝酸カリをそれぞれ 0.2% 及び 0.4% 添加した。

サイロは、詰込後 1, 2, 4 及び 30 日目に開封し、分析に供した。

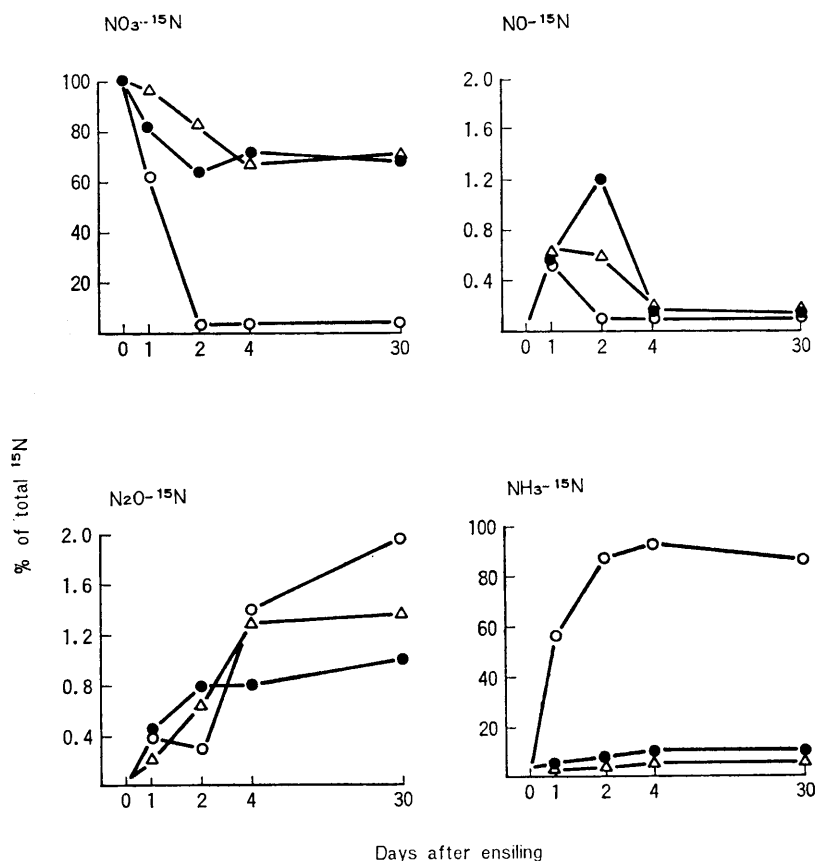
材料牧草の成分及びサイレージの品質は第2章第6節と同様の方法により、 ^{15}N は前節と同様の方法によりそれぞれ測定した。

3. 結 果

サイレージの品質の経時的変化は第2章第6節 (Table 32) で示した通りである。

硝酸カリの添加量が増加するにつれて、pH の低下が促進され、 $\text{NH}_3\text{-N}$ の生成が抑制されることが認められた。

$\text{NO}_3^{-15}\text{N}$, NO^{-15}N 及び $\text{NH}_3^{-15}\text{N}$ 含量の経時的変化は Fig. 19 に示した。



○ : nitrate 0.05% addition ● : nitrate 0.2% addition △ : nitrate 0.4% addition

Fig. 19. Changes in the amount of $\text{NO}_3^-^{15}\text{N}$, NO^{-15}N , $\text{N}_2\text{O}^{-15}\text{N}$ and $\text{NH}_3^{-15}\text{N}$ during ensilage.

$\text{NO}_3^-^{15}\text{N}$ 含量は、2日目まで急激に低下し、その後の変化は大きいものではなかった。30日目における $\text{NO}_3^-^{15}\text{N}$ 含量は詰込量のそれに対して、0.05%区、0.2%区及び0.4%区で、それぞれ3.0%、67.7%及び69.1%となり、特に0.05%でほとんど消失した。 NO^{-15}N の生成は、いずれの区においても、1~2日目でピークとなったが、以後消失し、代って $\text{N}_2\text{O}^{-15}\text{N}$ の生成がみられた。 NO^{-15}N と $\text{N}_2\text{O}^{-15}\text{N}$ の合計は0.4%区>0.2%区>0.05%区となり、材料の硝酸塩含量の高いものほど多かった。 $\text{NH}_3^{-15}\text{N}$ 含量は2日目までに急速に増加し、その後は徐々に増加したが、その程度は0.05%区で著しく、硝酸カリの添加量が多くなるにつれて低下することが認められた。30日目におけるその含量は詰込時の $\text{NO}_3^-^{15}\text{N}$ に対して、0.05%区、0.2%区及び0.4%区でそれぞれ93.0、10.3及び7.0%であった。

4. 考 察

サイレージの品質は、第2章第6節でも述べたようにすべて良質であったが、硝酸カリの添加量が多くなるにつれて、pHの低下が促進され、 $\text{NH}_3\text{-N}$ の生成が抑制され、品質が改善されることが示された。

$\text{NO}_3\text{-}^{15}\text{N}$ 含量及び $\text{NO-}^{15}\text{N}$ 含量の変化は、第2章第6節で示した $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量及び NO-N 含量の変化とほぼ軌を一にしている。即ち、 $\text{NO}_3\text{-}^{15}\text{N}$ の消失は1~2日目で急速に起こり、その程度は、硝酸カリの添加量が多くなるほど少なくなった。これは、材料の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が高くなるほど、調製中に消失する $\text{NO}_3\text{-N}$ の量が多くなるという本章第3節の結果と異なる。一方、サイレージ調製中の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量の低下は、pHによっても影響されることが認められている。材料牧草の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量は本章第3節の場合、材料牧草の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量はWSC含量と負の相関があり、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が高いものはWSC含量が低く、そのためサイレージは酪酸がなく品質が良好であってもpHは比較的高かったのに対し(第2章第1節を参照)、本実験では、材料の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が異っても、WSC含量は変わらず、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が高いものほどpHが低くなったためと考えられる。

$\text{NO-}^{15}\text{N}$ の生成は、 $\text{NO}_3\text{-}^{15}\text{N}$ の消失に伴って1~2日目に急速に起こり、その後消失して、 $\text{N}_2\text{O-}^{15}\text{N}$ の生成がみられ、それらの生成量は、硝酸カリの添加量が多くなるにつれて増加した。この結果は、 $\text{NO-}^{15}\text{N}$ の生成はpHが低いほど多くなるという前節の結果と類似している。

本実験においても、添加した ^{15}N -硝酸カリが発酵過程で ^{15}N -アンモニアへ還元されることを確認した。アンモニアへの還元の程度は、0.05%区で著しく多く、添加した $\text{NO}_3\text{-}^{15}\text{N}$ の93%が $\text{NH}_3\text{-}^{15}\text{N}$ となったのに対して、硝酸カリの添加が0.2%及び0.4%と増加するにつれて10.3%及び7.0%と減少した。この結果は、pHが低下する程 $\text{NH}_3\text{-}^{15}\text{N}$ 含量が低くなるという前節の結果と一致する。

また、全Nに対する $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量の比率の変化(Table 32)と全 ^{15}N に対する $\text{NH}_3\text{-}^{15}\text{N}$ 含量の比率の変化(Fig. 19)を比較すると、いずれも硝酸カリの添加量が多くなるにつれて低くなったが、前者は経時的に増加するのに対して、後者では2日目まで急速に増加し、以後の増加は少なかった。また、分解の程度は後者が高かった。このことは、サイレージ調製中の蛋白質の分解は主として嫌気性細菌によってなされるのに対して、硝酸塩の分解(還元)は好気性細菌によってなされていることを示唆している。

前節において、サイレージ調製における硝酸塩の還元経路は同化型と異化型の2種類があることを認めている。即ち、品質の悪いサイレージでは前者が主要な経路であり、材料の硝酸塩は、調製中にほとんどアンモニアに還元されるのに対し、良質サイレージでは、

硝酸塩は同化型と異化型の2つの経路によって還元され、アンモニアの他に一酸化窒素及び亜酸化窒素が生成される。さらに、この還元の様相はpHによって大きく影響されることが認められている。本実験においても、材料の硝酸塩含量が高くなるにつれてpHが低下し、これに伴って $\text{NO}_3^-^{15}\text{N}$ から NH_3^{15}N への還元が低下し NO^{15}N 及び $\text{N}_2\text{O}^{15}\text{N}$ への還元が増加し前節の結果とほぼ軌を一にしている。

以上のことから、サイレージの発酵過程における硝酸塩の還元の様相は次のように推論できる。まず硝酸塩は、好気性細菌の作用によって亜硝酸塩に還元される。このとき乳酸発酵によってpHが十分に低下していれば、好気性細菌の増殖が抑制され、硝酸塩から亜硝酸塩への還元は停止する。また、一旦生成された亜硝酸塩は遊離の亜硝酸となり、さらにある種の微生物の作用により一酸化窒素が生成される。サイロ内が嫌氣的になっていれば一酸化窒素はさらに亜酸化窒素に還元される。一方、pHが高い場合、好気性細菌の増殖が継続され、硝酸塩から亜硝酸塩への還元が促進されると同時に亜硝酸塩はアンモニアまで還元される。

食品微生物の分野において、硝酸塩あるいは亜硝酸塩を添加すると、不良細菌の増殖を抑制できるとされており、それは亜硝酸による抗菌作用であるといわれている。例えば、80 ppmの亜硝酸ナトリウムを含む培地では、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*) は増殖できない⁹⁹⁾。また、チーズを作る際、硝酸カリを添加すると、酪酸発酵が抑制されて、良質の製品ができるとされている⁸³⁾。この場合、酪酸発酵を抑制するのは硝酸塩そのものではなく、その還元産物である亜硝酸の作用であるとされている。一方、亜硝酸ナトリウムを含んだ製品がサイレージ添加剤として使用されており、その効果を確認した報告もみられる^{109,110)}。この製品の作用機作は発生する一酸化窒素が発酵初期の有害微生物の繁殖を防ぐためと考えられている¹⁰⁶⁾。

また、ある種の微生物は亜酸化窒素に対して特に敏感であることが知られている。大腸菌を亜酸化窒素を通気した培地で培養した結果、3つの株のうち1株だけが生き残ったと報告されている³¹⁾。

以上のことから、これまでに高硝酸塩含量の材料を用いてサイレージを調製すると例外なく、良質のサイレージが調製されたことは、調製中に硝酸塩の還元によって生じた一酸化窒素、あるいは亜酸化窒素が不良細菌の増殖を抑制したためと考えられる。

5. 要 約

^{15}N で標識した硝酸カリを、0.05、0.2及び0.4%の3段階で添加したサイレージを調製し、サイレージ品質の変化と硝酸塩の還元の様相を経時的に調べた。

硝酸カリの添加量が増加するにつれ、pHの低下が促進され、 $\text{NH}_3\text{-N}$ の生成が抑制さ

れた。

NO_3^- - ^{15}N は詰込後急速に消失したがその程度は、硝酸カリの添加量が多くなると少なくなった。 NO_3^- - ^{15}N 含量の低下は、硝酸塩の同化型代謝経路によるアンモニアへの還元によるものであったが、硝酸カリの添加量が多くなるにつれて、 NH_3 - ^{15}N の生成割合が低下し、異化型代謝経路による NO - ^{15}N 及び N_2O -N の生成量が多くなった。

これまでの実験から高硝酸塩の材料から例外なしに良質サイレージができるのは、硝酸塩の還元産物である一酸化窒素あるいは亜酸化窒素による不良菌の増殖抑制作用であると考えられる。

第4章 サイレージの飼料価値に及ぼす硝酸塩の影響

第1節 材料牧草の硝酸塩が消化率並びに第一胃内性状に及ぼす影響

1. 緒言

これまでに、硝酸塩がサイレージの品質を改善することを示唆する結果を得て、次いでこれを実証し、その作用機序について検討を加えた。サイレージは家畜の飼料とするものであるから、サイレージの良否は、最終的には飼料価値によって判定すべきであると考ええる。

本節では、窒素施肥量の異なるオーチャードグラス及びアルファルファからサイレージを調製し、それをメン羊に給与し、材料牧草の硝酸塩含量とサイレージの消化率及び第一胃内性状との関係を調査した⁶⁾。

2. 材料と方法

材料牧草及びサイレージは第1章第2節のものと同様である。

消化試験は、ルーメンフィステルを装着した去勢メン羊3頭を用い、サイレージの単一給与により予備期7日間、本試験期7日の全糞採取法により実施した。

サイレージの給与量は1日1頭当たり5kgとし、朝と夕の2回に分けて給与した。

ルーメン内容物は消化試験の最終日に、サイレージ給与後3時間目にルーメンフィステルより採取した。

水分、粗蛋白質は第1章第1節と同様の方法により、総エネルギー (GE) はボンブカロリーメーター (島津 CA2 型) により、細胞壁物質 (Cell wall constituents: CWC) は Van Soest ら¹²⁴⁾ の方法によりそれぞれ測定した。ルーメン内容物の pH は、ガラス電極 pH メーターにより、 NH_3 -N は蒸留法⁷⁶⁾ により、VFA は第2章第4節と同様にガスクロマトグラフィーによって測定した。

3. 結 果

サイレージの品質は、第1章第2節で示した如くオーチャードグラスでは、いずれも酪酸含量及び $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率の高い品質の悪いものであった。一方、アルファルファでは、材料の硝酸塩含量の低かった低窒素区で酪酸含量が著しく多く最も劣質であったが、材料の硝酸塩含量の高かった高窒素区では、酪酸のない良質のサイレージができた。

サイレージの化学組成及びその消化率は Table 45 に示した。

Table 45. Chemical composition and digestibility of the silages

	N applied (kg/10 a)	Chemical composition					Digestibility			
		Dry matter (%)	Crude protein	CWC ^{a)} (% DM)	$\text{NO}_3\text{-N}$ — (kcal/gDM)	GE ^{b)}	Dry matter	Crude protein	CWC ^{a)} (%)	GE ^{b)}
Alfalfa	10.0	19.3	18.3	51.7	0.07	4.70	55 ^b	67 ^{a,b}	48 ^b	54 ^b
	3.3	19.5	16.2	55.4	0.08	4.71	52 ^b	57 ^c	47 ^b	52 ^b
Orchardgrass	10.0	23.1	19.5	60.3	0.10	4.97	61 ^a	73 ^a	64 ^a	61 ^a
	3.3	26.3	14.4	62.1	0.08	4.83	57 ^b	62 ^{b,c}	62 ^a	58 ^b

a) Cell wall constituents.

b) Gross energy.

a, b, c: Values with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

化学組成では、いずれの草種においても、高窒素施肥により粗蛋白質含量が増加し、CWC 含量は低下した。 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量は、アルファルファの高窒素区で乾物中 0.17% から 0.07% へと著しく減少したが、その他の区では大きな変化はみられなかった。

各成分の消化率は両草種とも硝酸塩含量の高かった高窒素区が低窒素区より高く、特に粗蛋白質で著しかった ($P < 0.01$)。

消化率に及ぼす草種、窒素施肥の影響の分散分析は Table 46 に示した。

この表によると、サイレージの消化率は、窒素施肥量及び草種の違いによって大きく影響されることが認められる。即ち、乾物及び粗蛋白質の消化率は、窒素施肥量の増加によ

Table 46. Analysis of variance of digestibility

Factor	f	Dry matter	Crude protein	CWC ^{a)}	GE ^{b)}
Nitrogen fertilizer	1	48.40*	328.65***	5.20	23.80
Forage	1	100.34**	79.05*	685.54***	131.34**
Interaction	1	0.70	0.04	3.31	2.71
Silage	3	49.81*	135.91***	231.35***	52.62**
Error	8	8.31	7.65	15.24	11.20

a), b) Same as in Table 45.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Table 47. Average value and analysis of variance of rumen contents

Forage	N applied (kg/10 a)	pH	NH ₃ -N (mg/dℓ)	VFA (mM/dℓ)	VFA proportion (molar %)			
					Acetic	propionic	Butyric	Valeric
Alfalfa	10.0	6.73 ^{a,b}	34.9 ^a	5.7	62.7 ^a	22.2 ^a	9.7 ^b	5.3
	3.3	6.93 ^a	22.3 ^b	4.8	50.3 ^b	14.8 ^b	29.3 ^a	5.6
Orchardgrass	10.0	6.62 ^b	41.0 ^a	5.2	64.4 ^a	15.4 ^b	14.1 ^b	6.2
	3.3	6.46 ^{b,c}	33.3 ^a	5.7	67.2 ^a	15.5 ^b	12.1 ^b	5.2
f					Variance			
Nitrogen fertilizer	1	0.0016	311.1 ^{**}	0.120	69.1 [*]	40.37 ^{**}	232.3 ^{***}	0.333
Forage	1	0.2523 ^{**}	217.6 ^{**}	0.083	261.3 ^{**}	28.83 ^{**}	125.5 ^{**}	0.163
Interaction	1	0.0972 [*]	18.0	1.470 [*]	173.3 ^{**}	42.57 ^{**}	349.9 ^{***}	1.081
Silage	3	0.1170	182.2 [*]	0.558	167.9 ^{**}	37.24 ^{***}	235.9 ^{***}	0.526
Error	8	0.0122	24.8	0.202	12.5	1.91	3.5	0.955

a, b: Values with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

って有意に高くなり、また、すべての成分において、オーチャードグラスがアルファルファより有意に高いことが示された。

第一胃内性状とその分散分析は Table 47 に示した。

草種ごとに、窒素施肥量の影響をみると、アルファルファでは、pH 及び VFA 濃度には有意差は認められなかったが、NH₃-N 濃度は材料に硝酸塩含量が高かった高窒素区では高かった ($P < 0.01$)。また、VFA の組成は、酢酸及びプロピオン酸濃度において高窒素区が、酪酸濃度において低窒素区がそれぞれ有意に高い値を示した ($P < 0.01$)。一方、オーチャードグラスでは、窒素施肥量の影響は認められなかった。

分散分析の結果では、NH₃-N 濃度並びに酢酸、プロピオン酸及び酪酸濃度は窒素施肥量によって、また、pH、NH₃-N 濃度並びに酢酸、プロピオン酸及び酪酸濃度は、草種によってそれぞれ有意に影響されることが認められた。

4. 考 察

サイレージの消化率、特に粗蛋白質のそれは、両草種とも材料に硝酸塩含量の高かった高窒素区が有意に高い値を示した。窒素施肥量の増加によって、サイレージの粗蛋白質の消化率が高くなることはすでに多くの報告^{44,45,46)}によって認められている。

消化率における草種間の差では、各成分特に、CWC においてアルファルファがオーチャードグラスに比較して有意に低いことが示された (Table 45)。名久井ら⁷⁸⁾は、アルファ

ルファ乾草の CWC 消化率はオーチャードグラス乾草に比較して著しく低かったと報告している。これらの結果は、アルファルファの繊維質が木質化しており、消化されにくいことを示唆している。また、消化率において、窒素施肥と草種の交互作用はみられず、窒素施肥の影響の程度は草種によって変わらないことが示された。このことは、高窒素施肥に伴う材料牧草の硝酸塩含量の増加によって、サイレージの消化率が高くなることを示している。

しかしながら、高窒素施肥による消化率の向上が、硝酸塩の増加によるものか、その他の成分の影響によるものか明確でないので、これについてはさらに次の節で検討することにする。

第一胃内性状において、オーチャードグラスサイレージでは、窒素施肥量の影響は高窒素区で $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度が高かった以外、ほとんど影響は認められなかった。和泉⁴⁷⁾は、窒素施肥量を異にするチモシー主体のサイレージを牛に給与した際、 $\text{NH}_3\text{-N}$ 濃度及び VFA 濃度は高窒素区が高かったが、pH 及び VFA 組成には窒素施肥量の影響は明確ではなかったと報告しており、本実験のオーチャードグラスの結果と類似している。一方、本実験のアルファルファでは、材料の硝酸塩含量の高かった高窒素区において $\text{NH}_3\text{-N}$ 、酢酸及びプロピオン酸濃度の増加並びに酪酸濃度の低下が認められた。このように第一胃内性状に対して窒素施肥量の影響が草種によって異なった理由として、サイレージの品質の違いが考えられる。即ち、第 1 章第 2 節で示した如く、オーチャードグラスの場合、材料の硝酸塩含量が低かったため窒素施肥量によってサイレージ品質は影響されなかったが、アルファルファの高窒素区では材料の硝酸塩含量が高かったため、良質のサイレージができ、硝酸塩含量の低かった低窒素区では品質の悪いサイレージができた。従って、第一胃内の酪酸濃度は、アルファルファ低窒素区 > オーチャードグラス低窒素区 > 同高窒素区 > アルファルファ高窒素区の順となり、サイレージの酪酸含量の順と一致した。また、プロピオン酸濃度は、ほぼ酪酸濃度の逆となり、サイレージの品質が良いものほど高くなった。

サイレージ品質と第一胃内性状との関係について、端的に検討した報告は少ないが、内田ら¹²⁰⁾は、イタリアンライグラスの水分含量を変えて、品質の異なるサイレージを調製し、これをメソ羊に給与したところ、酢酸濃度は、品質の良いものほど高くなり、*n*-酪酸濃度はその逆になることを認めている。また、小麦及び牧草に対して粉末トウモロコシ、尿素及び炭酸カルシウムを添加して品質の異なるサイレージを調製し、乳牛に給与した McCullough ら⁶⁴⁾の実験では、劣質サイレージ給与時には、プロピオン酸濃度が低くなり、*n*-酪酸及び *n*-吉草酸濃度が高くなったと報じている。さらに、牧野ら⁵⁶⁾は、乳酸を第一胃内に投与した場合、速やかに VFA 分画に現われ品質の良いサイレージを給与した場合

には乳酸をプロピオン酸に変化させる能力が高くなると報告している。

以上のことから、材料に硝酸塩含量が高くなると、調製されたサイレージは良質となり、消化率及びルーメン発酵も改善されることが示唆された。

5. 要 約

材料の硝酸塩含量によるサイレージ品質の差が、サイレージの消化率及び第一胃内性状に及ぼす影響を検討するため、窒素施肥量を異にするオーチャードグラス及びアルファルファを用いてサイレージを調製し、これをフィステルの装着されたメン羊に給与した。

硝酸塩含量の高い材料から調製された良質のサイレージでは、硝酸塩含量の低い材料から調製された劣質のサイレージに比較して、消化率並びに第一胃内のプロピオン酸濃度が有意に高くなり、酪酸濃度が有意に低くなった。

第2節 硝酸塩添加が消化率、窒素・ミネラル出納並びに 臨床生化学的所見に及ぼす影響

1. 緒 言

前節において、高窒素施肥によって、硝酸塩含量の高くなった牧草から調製したサイレージは、低硝酸塩含量の牧草から調製したものより品質が良く、かつ、第一胃内性状もすぐれることを認め、材料に硝酸塩含量が高くなるとサイレージの飼料価値が改善されることが示唆された。

本節ではこのことについてさらに詳細に検討するため、材料牧草への窒素施肥及び詰込時における硝酸塩添加によって、材料の硝酸塩含量を変えてサイレージを調製し、品質、消化率、窒素・ミネラル出納及び臨床所見などについて調査する実験を行った¹⁶⁾。

2. 材料と方法

材料牧草には、酪農学園大学試験圃場で栽培した穂孕期のオーチャードグラス（品種：キタミドリ）を用いた。試験圃場は、窒素施肥量によって標準区、多肥区及び過肥区の3区に分け、それぞれ10アール当たり7.5、15及び30 kg N施用した。りん酸及び加里は各区同一量とし、それぞれ10 kg及び20 kg施用した。

牧草は1974年6月3日にモアールで刈取り、直ちにカッターで2～3 cmに切断して、多肥区及び過肥区は無添加で、標準区に対しては、硝酸カリを0、0.2及び0.4%の3段階で添加して、それぞれ220 kg容プラスチックバックサイロに3反復して詰込んだ。サイレージは約3カ月の埋蔵後、メン羊による消化・出納試験のため開封した。

飼養試験は、去勢メン羊5頭（平均体重58.1 kg）を用い、4期のユーデン方格法¹³⁵⁾により実施した。

消化・出納試験は、予備期 7 日、本実験期 5 日の全糞尿採取法により実施した。

メソ羊は、代謝試験用ゲージに収容し、飼料はサイレージ単一給与とし、1 日 1 頭当たり 5 kg を朝と夕の 2 回に分けて給与した。また、水は自由飲水とし、ミネラルは給与しなかった。

材料牧草の化学組成は第 1 章第 1 節と同様の方法により、サイレージでは水分をトルエン蒸留法⁷⁶⁾で、粗蛋白質を新鮮物を用いて測定した以外、材料と同様に行った。また GE の測定は前節と同様に、細胞壁構成物質の CWC 及び ADF は Van Soest らの方法^{123,124)}によりそれぞれ測定した。ミネラルは、湿式灰化後⁷⁶⁾、Ca, Mg 及び K は原子吸光法⁷⁶⁾により、P は比色法⁷⁶⁾によりそれぞれ定量した。サイレージの品質は第 2 章第 4 節と同様の方法により分析した。

3. 結 果

1. 牧草の生育状況

材料牧草の生育状況は Table 48 に示した。

Table 48. Outline of forages ensiled

Level of N fertilizer	Fertilizer applied (kg/10 a)			Height of plant (cm)	Dry matter yielded (kg/10 a)
	N	P ₂ O ₅	K ₂ O		
Medium	7.5	10	20	68	260
High	15.0	10	20	71	358
Super	30.0	10	20	82	438

刈取時における牧草の生育時期はいずれも穂孕期であったが、窒素施肥量が増加するにつれて、草丈及び収量が高くなった。

2. 化 学 組 成

材料牧草及びサイレージの化学組成はそれぞれ Table 49 及び Table 50 に示した。

Table 49. Chemical composition of material ensiled

Level of N fertilizer	Nitrate ^{a)} addition (%)	Moisture (%)	Crude protein ————— (% of DM)	WSC —————	NO ₃ -N —————
Medium	0	81.8	19.6	8.5	0.09
	0.2	81.6	20.3	8.4	0.24
	0.4	81.5	21.1	8.3	0.38
High	0	80.2	22.6	7.6	0.13
Super	0	81.3	24.9	7.1	0.25

a) Potassium nitrate.

Table 50. Chemical composition of the silages

Level of N fertilizer	Nitrate ^{a)} addition (%)	Moisture (%)	Crude protein	Crude fat	Crude ash	CWC ^{b)}	ADF ^{c)}	GE ^{d)} (kcal/gDM)
					(% of DM)			
Medium	0	81.6	19.1	7.3	10.1	51.5	33.9	3.89
	0.2	81.7	18.1	8.0	10.3	53.8	32.3	4.28
	0.4	80.8	18.6	7.0	11.3	53.0	33.1	4.22
High	0	81.8	22.4	7.6	10.9	54.3	34.3	4.32
Super	0	81.9	23.8	7.3	16.3	52.8	32.3	4.34

a) Potassium nitrate.

b) Cell wall constituents.

c) Acid detergent fiber.

d) Gross energy.

窒素施肥量の増加によって、材料牧草の粗蛋白質及び硝酸塩含量は顕著に増加し、WSC 及び細胞壁構成物質含量は減少した。これらの成分のうち、サイレージ調製によって著しく変化した成分は、粗脂肪、硝酸塩及び細胞壁構成物質であった。即ち、粗脂肪及び ADF 含量は増加し、CWC 及び硝酸塩含量は減少した。また GE も減少した。

3. サイレージの品質

サイレージの品質は Table 51 に示した。

Table 51. Quality of the silages

Level of N fertilizer	Nitrate ^{a)} addition (%)	pH	Acids (% of fresh silage)							Flieg's mark	NH ₃ -N ^{b)}
			Lact.	Acet.	Prop.	But.	Val.	Cap.	Total		
Medium	0	5.5	0.02	0.39	0.13	0.74	0.10	0.38	1.75	7	35.2
	0.2	4.6	0.86	0.51	0.04	0.01	0	0	1.41	73	12.3
	0.4	4.8	1.09	0.58	0.07	0.06	0	0.02	1.82	39	15.0
High	0	6.3	0.01	0.45	0.14	0.49	0.10	0.13	1.31	-10	36.9
Super	0	5.3	0.37	0.49	0.02	0.15	0.05	0	1.08	5	19.2

a) Potassium nitrate.

b) % of total nitrogen.

標準区のサイレージは、pH が高く、乳酸がなく、酪酸及び高級 VFA 含量並びに NH₃-N 比率の高い、極めて品質の悪いものであったが、多肥区ではさらに品質が悪くなった。一方、過肥区では乳酸が少量生成し、酪酸生成が著しく少なくなり、品質が改善された。また、硝酸カリを添加したサイレージでは、乳酸含量が高くなり、酪酸のない、あるいは極めて少ない良質のサイレージができた。硝酸カリ添加量の比較では、0.2% 添加区の方が 0.4% 添加区のサイレージより品質がすぐれた。

Table 52. Digestibility and nutritive value of the silages

Level of N fertilizer	Nitrate ^{a)} addition (%)	Dry matter	Crude protein	Crude fat	CWC ^{b)}	ADF ^{c)}	GE ^{d)}	DCP	TDN	DE ^{e)}
					(%)			—(% of DM)—		(kcal/gDM)
Medium	0	67 ^a	74 ^a	73 ^a	64 ^a	64 ^a	62 ^a	14.4	68.4	2.41
	0.2	72 ^b	77 ^b	78 ^b	71 ^b	70 ^b	69 ^b	14.2	73.6	2.97
	0.4	72 ^b	77 ^b	74 ^a	70 ^b	70 ^b	70 ^b	14.4	71.1	2.93
High	0	68 ^a	77 ^b	74 ^a	68 ^b	68 ^b	66 ^b	17.4	68.5	2.85
Super	0	70 ^b	80 ^c	74 ^b	67 ^b	67 ^b	67	18.8	70.7	2.91

a), b), c), d) Same as in Table 51.

e) Digestible energy.

a, b, c: Values with different superscript letters are significantly different ($P < 0.05$).

4. 消 化 率

サイレージの消化率及び可消化養分は Table 52 に示した。

標準区の消化率はすべての成分において最も低かった。窒素施肥量の影響では、粗蛋白質の消化率は、施肥量の増加に伴って有意に高くなり、また、GEの消化率も同様に高くなる傾向があったが、その他の成分には差が認められなかった。一方、硝酸カリを添加すると、すべての成分において標準区より有意に高くなった。また、硝酸カリの添加量による差は認められなかった。これらの結果から DCP 含量は、窒素施肥量が高くなるにつれて高くなったが、硝酸カリ添加の影響はなかった。TDN 及び可消化エネルギー (DE) 含量は標準区が最も低く、硝酸カリ 0.2% 添加区が最も高く、他の区はその中間であった。

5. 窒 素 出 納

窒素出納試験の結果は Table 53 に示した。

窒素摂取量は、窒素施肥量の増加に伴って増加したが、標準区と硝酸カリ添加区では差がなかった。糞中への窒素排泄量は、窒素施肥量の増加によって高くなる傾向があった。

Table 53. Nitrogen balance data

Level of N fertilizer	Nitrate ^{a)} addition (%)	N intake (g/day)	Fecal N (g/day)	Urinary N (g/day)	Retained N (g/day)	N retention ^{b)} (%)
Medium	0	27.9	7.2	19.5	1.2	4.3
	0.2	26.6	6.1	15.8	4.7	17.7
	0.4	28.6	6.5	17.8	4.3	15.0
High	0	32.5	7.5	23.1	1.9	5.8
Super	0	34.5	7.0	22.8	4.7	13.6

a) Potassium nitrate.

b) % of intake.

が、硝酸カリの添加によって減少した。その結果、蓄積量は標準区及び多肥区でそれぞれ1日当り1.2 g 及び1.9 g と少なかったが、過肥区並びに硝酸カリ0.2% 及び0.4% 添加区でそれぞれ4.7 g 及び4.3 g と有意に増加した。

6. ミネラル出納

サイレージのミネラル含量及び出納は Table 54～Table 58 に示した。

カルシウムにおいては標準区及び多肥区では、糞中及び尿中への排泄量が多く、負の蓄

Table 54. Nitrate and mineral content of the silages

Level of N fertilizer	Nitrate ^{a)} addition (%)	NO ₃ -N	Ca P Mg K			
			(% of DM)			
Medium	0	0.06	0.39	0.36	0.15	3.60
	0.2	0.06	0.38	0.36	0.15	3.90
	0.4	0.06	0.39	0.36	0.14	4.21
High	0	0.07	0.36	0.40	0.16	4.12
Super	0	0.06	0.35	0.38	0.17	3.86

a) Potassium nitrate.

Table 55. Calcium balance data

Level of N fertilizer	Nitrate ^{a)} addition (%)	Ca intake (g/day)	Fecal Ca (g/day)	Urinary Ca (g/day)	Retained Ca (g/day)	Ca retention ^{b)} (%)
Medium	0	3.42	3.87	0.06	-0.51	-14.9
	0.2	3.49	3.30	0.05	0.14	4.0
	0.4	3.59	3.55	0.03	0.01	0.3
High	0	3.28	3.67	0.05	-0.44	-13.4
Super	0	3.21	3.16	0.06	-0.01	-0.3

a), b) Same as in Table 53.

Table 56. Phosphorus balance data

Level of N fertilizer	Nitrate ^{a)} addition (%)	P intake (g/day)	Fecal P (g/day)	Urinary P (g/day)	Retained P (g/day)	P retention ^{b)} (%)
Medium	0	3.40	3.61	0.01	-0.22	-6.5
	0.2	3.28	3.18	0	0.10	3.0
	0.4	3.40	3.31	0.02	0.07	2.1
High	0	3.63	3.70	0.01	-0.08	-2.2
Super	0	3.47	3.35	0.01	0.11	3.2

a), b) Same as in Table 53.

Table 57. Magnesium balance data

Level of N fertilizer	Nitrate ^{a)} addition (%)	Mg intake (g/day)	Fecal Mg (g/day)	Urinary Mg (g/day)	Retained Mg (g/day)	Mg retention ^{b)} (%)
Medium	0	1.41	1.11	0.22	0.88	5.7
	0.2	1.34	1.13	0.19	0.02	1.5
	0.4	1.42	1.13	0.16	0.13	9.2
High	0	1.44	1.05	0.17	0.22	15.3
Super	0	1.52	1.11	0.18	0.23	15.1

a), b) Same as in Table 53.

Table 58. Potassium balance data

Level of N fertilizer	Nitrate ^{a)} addition (%)	K intake (g/day)	Fecal K (g/day)	Urinary K (g/day)	Retained K (g/day)	K retention ^{b)} (%)
Medium	0	34.0	4.9	27.9	1.2	3.5
	0.2	35.4	4.0	30.1	1.3	3.7
	0.4	40.0	4.6	33.5	1.9	4.8
High	0	37.6	5.0	30.4	2.2	5.9
Super	0	34.8	4.4	28.0	2.4	6.9

a), b) Same as in Table 53.

積であった。また、過肥区では、糞中への排泄量が少なくなったが、わずかに負の蓄積となった。一方、硝酸カリを添加した区では、いずれも糞中への排泄量が少なくなり、正の蓄積となった。

リンはカルシウムと同様、標準区及び多肥区では蓄積量が負であった。一方、過肥区及び硝酸カリ添加区では正の蓄積量が示された。

マグネシウム及びカリウムはいずれも正の蓄積が示され、各区の差は認められなかった。

7. 臨床生化学的所見

飼養試験の全期間を通して、各区とも供試メン羊は臨床的に異状を示すことはなかった。しかし標準区のサイレージを摂取したメン羊は時々軟便であった。

尿検査においては、pH、潜血、ブドウ糖、ウロビリノーゲン、蛋白質に異常は認められなかったが、標準区のサイレージを摂取したメン羊には一時的に多量のケトン体が検出された。

また、すべての期間中、どのメン羊にも、血中メトヘモグロビン及び血中亜硝酸塩は検出されなかった。

4. 考 察

標準区及び多肥区のサイレージは、pHが高く、酪酸及び高級VFA並びに $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率の高い、著しく劣質なものであったが、過肥区では、酪酸及び高級VFAの生成が著しく抑制された。また、標準区の材料に硝酸カリを0.2%及び0.4%添加すると酪酸生成が強く抑制され、品質が改善された。この場合材料の乾物中 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量は、標準区、多肥区、過肥区、硝酸カリ0.2%添加区及び硝酸カリ0.4%添加区においてそれぞれ0.09, 0.13, 0.24, 0.25及び0.38%であり、 $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が高かった過肥区及び硝酸カリ添加のサイレージで、酪酸生成が少なくなったことは、これまでの傾向と一致している。

硝酸塩含量がサイレージ調製中に減少することはすでに認められており、本実験においてもサイレージの硝酸塩含量は乾物中 $\text{NO}_3\text{-N}$ としては0.06~0.07%と著しく低い値になった。また、サイレージ調製によって、粗脂肪及びADF含量が増加し、CWC含量が低下することが認められた。粗脂肪含量の増加は、サイレージの有機酸が粗脂肪として定量されたものであり、CWC含量の低下は、微生物によってヘミセルロースが利用されたためと考えられる。しかし、ADF含量の増加は明らかでない。

サイレージの消化率は、早刈りのため、いずれの区においても高い値を示したが、標準区及び多肥区のものより、過肥区及び硝酸カリを添加した区のサイレージが有意に高くなった。また、窒素、カルシウム及びリンの出納においても、過肥区、硝酸カリ0.2%及び0.4%添加区のサイレージにおいて、その蓄積量が増加することが示された。

Hallら³⁴⁾はオーチャードグラス乾草に硝酸ナトリウムを2.5g及び5.0g添加したとき、メン羊の乾物並びにセルロースの消化率が無添加より有意に低くなったことを報告している。一方、宮崎ら⁷⁴⁾は、反芻動物に硝酸塩を投与すると、特に硝酸中毒と思われる症状を現わさない程度の投与量でも、硝酸塩が増体や飼料利用性に悪影響を及ぼすことを認め、その原因として、硝酸塩の多給は、第一胃内の微生物の活性に悪影響を与え、ひいては消化率の低下をもたらすのではないかと考え、消化率及び窒素の出納試験を実施したところ、硝酸塩の添加によって乾物及び粗蛋白質の消化率はむしろ向上したが、尿中への窒素の排泄量が増加し、利用は特によくなることはなかったと報じている。

本実験は、窒素施肥及び硝酸カリの添加によって材料の硝酸塩含量を変えてサイレージを調製し、その品質及び飼料価値を検討したものであるが、硝酸塩含量はいずれも調製中にはほとんどが消失した。従って、本実験における、材料の硝酸塩含量の増加によるサイレージの飼料価値の改善効果は、硝酸塩によるサイレージ品質の改善効果によるものと考えられる。

サイレージの品質と飼料価値の関係では、高橋^{110,111)}、Waldoら¹²⁵⁾及び内田ら¹¹⁹⁾は同

一の材料を用いて、それぞれ調製法を変えて品質の異なるサイレージを調製した場合、品質のよいサイレージほど、消化率及び TDN 含量が高くなり、窒素出納が改善されることを認めている。

しかし、サイレージの品質とミネラル出納との関係について、検討した報告は見当らない。本実験において、カルシウム及びリンはいずれの区においても要求量以上を給与したにもかかわらず、サイレージ品質の悪かった、標準区及び多肥区では、負の蓄積が示されたが、品質の比較的良かった過肥区及び硝酸カリ添加区では、ほぼ平衡あるいは正となり、品質の良いもののほどその利用性が高くなることが示唆された。この理由については明らかではないのでさらに検討する必要があると考えられる。

また、本実験において、血中亜硝酸塩及びメトヘモグロビンの形成は全く認められなかった。このことは、すべてのサイレージにおいて材料の硝酸塩が調製中にほとんど消失したことから、十分に理解できる。

以上のように、硝酸塩含量の高い牧草をサイレージにすると、調製中に硝酸塩は大部分消失し、さらに品質並びに飼料価値の高いサイレージができることを確認した。

従って、サイレージは硝酸塩含量の高い牧草の安全でかつ有効な利用法であると考えられる。

5. 要 約

窒素施肥及び硝酸カリを添加して、材料の硝酸塩含量を変えて、サイレージを調製し、メン羊 4 頭を用いて消化試験及び窒素並びにミネラル出納試験を行った。

窒素施肥及び硝酸カリ添加によって材料の硝酸塩含量が高くなると、サイレージの品質、消化率及び窒素、カルシウム並びにリンの出納が改善された。

硝酸塩含量は調製中に著しく減少し、メン羊の血中に亜硝酸塩及びメトヘモグロビンの形成がみられなかった。以上のことから、サイレージは硝酸塩含量の高い牧草の安全かつ有効な利用法であると考えられた。

総 括

牧草は、生育に必要な窒素源として、土壌水中の硝酸塩を吸収する。吸収された硝酸塩は急速に同化されてアミノ酸、さらに蛋白質が合成されるが、この吸収と同化のバランスが乱されると、ときとして、植物体に多量の硝酸塩を蓄積することがある。このような牧草を反芻動物が摂取すると、硝酸中毒を起こしやすいことは周知の事実である。一方、牧草の硝酸塩含量はサイレージ調製によって減少することが報告されている。しかし、サイレージ発酵過程で硝酸塩含量が減少する機序、並びにサイレージ発酵に及ぼす硝酸塩の影

響についてはほとんど知られていない。

本研究は、サイレージ発酵における硝酸塩の役割、並びにそれがサイレージ品質及び反芻動物の栄養生理に及ぼす影響を検討したものである。

その結果の概要は次の如くである。

I. サイレージの品質に及ぼす窒素施肥の影響

(1) チモシー主体の1番刈牧草に対して、窒素を10アール当り0, 5, 10及び15 kgの4段階で施用し、バックサイロにサイレージを調製し、窒素施肥量と品質の関係を直交多項式を用いて解析した。牧草の成分では、窒素施肥量の増加に伴って粗蛋白質含量は増加し、WSC含量は減少したが、硝酸塩含量はいずれも低く、施肥量の影響はなかった。直交多項式から窒素施肥量が増加するにつれてサイレージ品質が悪くなることが示された。

(2) 材料牧草の草種、刈取時期及び水分含量を変えて、窒素施肥(2段階)の影響を検討した。いずれの草種においても、窒素施肥量の増加に伴って、水分、粗蛋白質及び硝酸塩含量が増加し、WSC含量は減少した。サイレージの品質は、8例中1例を除いて窒素施肥量の増加に伴って著しく改善された。

(3) 造成段階から3年間にわたって、オーチャードグラスに対して窒素を10アール当り0, 5, 10及び20 kgの4段階で施用し、サイレージを調製した。窒素施肥量の増加に伴って、牧草の水分、粗蛋白質及び硝酸塩含量が増加し、WSC含量は減少した。サイレージの品質は初年目はすべて良質であったが、さらに窒素施肥量の増加に伴い向上した。2年目及び3年目では、それぞれ5 kg N及び10 kg Nまで窒素施肥量が増加するにつれて品質が悪くなったが、それ以上の高窒素施肥では最も良質のサイレージができた。即ち、高窒素施肥によって材料牧草の $\text{NO}_3\text{-N}$ 含量が乾物中0.19%以上になると、高蛋白質、低WSC含量にもかかわらず、例外なしに良質のサイレージができることを認めた。

以上の結果から、窒素施肥がサイレージの品質に及ぼす影響には3つの型が存在することを確認した。即ち、(1) 窒素施肥の増加によってサイレージの品質が悪くなる、(2) 逆によくなる、(3) 変わらない、の3つである。これを材料成分との関連で考察すると、(1)と(2)では、窒素施肥量の増加によって、牧草の粗蛋白質含量は増加し、WSC含量は減少する。そして硝酸塩含量は(1)では増加しないが(2)では多量に蓄積(乾物中 $\text{NO}_3\text{-N}$ で0.19%以上)する。一方、(3)では窒素施肥量の増加に伴って牧草の粗蛋白質含量は増加するが、WSC含量と硝酸塩含量は変化せず、WSC含量が高い場合には良質のサイレージができ、WSC含量が低くければ劣質サイレージができると考えられた。

以上のことから、硝酸塩がサイレージの品質の改善に寄与することが示唆された。

II. サイレージ発酵に及ぼす硝酸塩の影響

(1) 年次、番草及び窒素施肥を異にするオーチャードグラスを用いて、バックサイロに31点のサイレージを調製し、材料牧草とサイレージ品質との関係を解析した。材料牧草の硝酸塩含量は、サイレージの酢酸含量 ($r=0.838$)、酪酸含量 ($r=-0.586$)、総酸含量 ($r=0.480$) 及びフリーク評点 ($r=0.485$) と有意な相関を示した。さらに硝酸塩含量が高い場合(乾物中 $\text{NO}_3\text{-N}$ で0.2%以上)は、WSC含量や粗蛋白質含量にかかわりなく、例外なしに酪酸生成のない良質のサイレージができた。以上のことから、牧草の硝酸塩含量はサイレージの品質改善に寄与するものと考えられた。

(2) 窒素施肥量を変えて硝酸塩含量の異なる牧草を材料として無添加、あるいはこれらの牧草に硝酸カリを0.15%及び0.3%添加してサイレージを調製し、その品質を調べた。硝酸カリを添加すると、すべてpHの低い、乳酸含量の多い、酪酸生成のない、そして $\text{NH}_3\text{-N}$ 比率の少ない良質のサイレージができた。また、高窒素施肥による硝酸塩含量の高い牧草からも同様に良質のサイレージが得られることを確認した。以上のことから硝酸塩がサイレージの品質を改善することが実証された。

(3) オーチャードグラス及びアルファルファを用いて、サイレージの品質に及ぼす硝酸カリ添加(0, 0.1, 0.2, 0.3及び1.0%)の効果をグルコース添加(0%及び2%)との関連で検討した。オーチャードグラス及びアルファルファにおいて、硝酸カリをそれぞれ0.1%及び0.2%以上添加すると、酪酸がほとんどない良質のサイレージができた。硝酸カリとグルコース添加の効果比較では、オーチャードグラスに対しては前者がすぐれ、アルファルファでは後者がややすぐれ、両者の併用による効果は、オーチャードグラスにおいて認められたが、アルファルファの場合、グルコース単独添加で極めて良質のサイレージができたため、併用効果は認められなかった。以上のことから、WSC含量の著しく低い材料の場合でも、硝酸塩を添加すると酪酸のない良質サイレージができることが認められた。

(4) 硝酸塩がサイレージの品質に及ぼす影響を糖添加並びに埋蔵温度(20°C及び30°C)との関連で検討した。サイレージは高温(30°C)条件及びグルコース無添加の場合、品質が悪くなったが、硝酸カリを添加すると、これらの悪条件のもとでも良質のサイレージができることを認めた。

(5) 硝酸カリ添加、グルコース添加及び温度がサイレージの乳酸異性体分布にどのように影響するかを検討した。全乳酸、L(+)乳酸及びD(-)乳酸含量は、グルコース添加及び硝酸カリ添加によって高くなる傾向がみられたが、乳酸異性体の割合には変化がなかった。L(+)乳酸は温度によって影響されなかったが、全乳酸及びD(-)乳酸含量は30°Cで低下した。その結果、全乳酸に対するL(+)乳酸の割合は30°Cの場合が20°Cより高くな

った。

(6) 硝酸塩がサイレージの品質を改善する機序を検討するために、材料に硝酸カリを3段階(0.05, 0.2 及び 0.4%)で添加し、サイレージの発酵経過を調べた。いずれのサイレージも良質であったが、硝酸塩の添加量が多くなるにつれて、サイレージの pH 低下が促進され、アンモニアの生成が抑制された。この実験において2, 3-ブタンジオールを検出したが、その生成量は硝酸カリの添加量が多くなるにつれて、少なくなった。硝酸塩含量は埋蔵後1~2日目で急激に低下し、一酸化窒素及び亜酸化窒素の生成がみられた。これらの生成量は硝酸カリの添加量が多くなるほど増加した。以上のことから、サイレージの品質は硝酸塩の消長と密接な関係があることが示唆された。

III. サイレージ発酵における硝酸塩の還元

(1) サイレージ調製中における硝酸塩の消長を検討するため、硝酸塩の定量法として、イオン電極法による定量を試みた。イオン電極法は従来の方法(Morris 法)に比較して、操作が簡便で、迅速に実施でき、精度も従来の方法よりすぐれることが認められた。

(2) サイレージ及び乾草調製における硝酸塩含量の変化を比較した。材料の硝酸塩含量が低い場合には、いずれの調製法によっても、硝酸塩含量に変化は認められなかった。一方、材料の硝酸塩含量が高かった場合には、乾草では変化がなかったが、サイレージ調製によって硝酸塩含量は著しく減少した。即ち、サイレージ調製では材料の硝酸塩含量が高くなるにつれて、調製中における硝酸塩の消失量が多くなり、両者の間には有意な正の相関が認められた。このことから、サイレージは、硝酸塩含量の高い牧草の利用法として好ましい方法であると思われた。

(3) 材料成分並びにサイレージ品質と調製中の硝酸塩含量の変化との関係について検討した。調製中における硝酸塩の消失量は、材料牧草の硝酸塩含量及びサイレージの pH と有意な正の偏相関を有し、材料牧草の WSC 含量とは有意な負の偏相関があった。硝酸塩消失がある場合には、常に酪酸のない良質のサイレージが得られることを認めた。

(4) サイレージの品質が調製中の硝酸塩の消長と、どのような関係を有するかを検討するために、密封時期、温度及び水分含量を変えてサイレージを調製し、品質と硝酸塩含量の関係を調べた。その結果、サイレージの硝酸塩含量は pH と負の相関があり、pH が高くなるほど低くなることが示された。

(5) サイレージ調製中における硝酸塩含量の変化と微生物相の変化との関連を検討した。硝酸塩含量の低下の時期及びその程度は、好気性細菌の増殖の時期及びその程度とよく同調した。このことから、サイレージ調製における硝酸塩含量の減少は、好気性細菌による硝酸塩還元作用であると推測された。

(6) サイレージ調製における硝酸塩の還元の様相と品質の関係を知るために ^{15}N で標識した硝酸カリを添加し、品質の異なるサイレージを調製し、その還元経路を経時的に追跡した。 NO_3^- - ^{15}N 含量は埋蔵後急速に減少し、それに伴い NO - ^{15}N の生成が認められたが4日目以後消失した。また、サイレージ調製によって NO_3^- - ^{15}N から NH_3 - ^{15}N への還元が認められた。

NO_3^- - ^{15}N の減少並びに NO - ^{15}N 及び NH_3 - ^{15}N の生成は埋蔵初期の pH と密接な相関関係があり pH が高くなるほど硝酸塩の減少が著しくなり、硝酸塩からアンモニアの還元が促進され、酸化窒素の生成が抑制されることが示された。

(7) 材料の硝酸塩含量が高くなると良質のサイレージができる機序を明らかにするため、 ^{15}N で標識した硝酸カリを3段階で添加して、硝酸塩の還元の様相とサイレージの品質との関係を調べた。硝酸カリの添加量が多くなるにつれて、pH の低下が促進され、アンモニアの生成が抑制された。 NO_3^- - ^{15}N 含量は詰込後急速に減少したが、これは硝酸カリの添加によって抑制された。材料の硝酸塩含量が低い場合、硝酸塩は主として同化型の還元経路によってアンモニアへ還元されたが、硝酸カリの添加量が多くなると、アンモニアへの還元が低下し、一酸化窒素あるいは亜酸化窒素の生成量が多くなった。

以上のことから、サイレージ調製中における硝酸塩の還元の様相はサイレージ品質特に pH と密接な関係があることが示され、劣質サイレージでは硝酸塩はほとんどアンモニアまで還元されるのに対し、良質サイレージでは硝酸塩の消失量は少ないが、硝酸塩から一酸化窒素、亜酸化窒素の生成量が増加することが明らかにされた。そして、硝酸塩含量の高い材料から良質のサイレージができる機序は、硝酸塩の還元産物である一酸化窒素あるいは亜酸化窒素による不良細菌の抑制効果であると考えられた。

IV. サイレージの飼料価値に及ぼす硝酸塩の影響

(1) 窒素施肥量を変えて硝酸塩含量の異なる材料牧草からサイレージを調製し、それをメン羊に給与し、消化率並びに第一胃内性状を調査した。サイレージの消化率は窒素施肥の増加に伴って向上した。また第一胃内性状は、材料牧草の硝酸塩が高かったサイレージの場合には、VFA の組成のプロピオン酸濃度が高くなり酪酸濃度が低下した。

(2) 窒素施肥 (3 段階) 及び硝酸カリ添加 (0.2% 及び 0.4%) によって材料の硝酸塩含量を変えてサイレージを調製し、メン羊を用いて消化試験及び窒素並びにミネラル出納試験を行った。高窒素施肥及び硝酸カリの添加によって材料の硝酸塩含量が高くなると、サイレージの品質が著しく改善され、メン羊による消化率及び窒素、カルシウム並びにリンの出納も改善された。また、硝酸塩含量は調製中にほとんど消失し、そのためこれを給与されたメン羊には何ら臨床生化学的な悪影響は認められなかった。

以上、本研究は、サイレージ発酵において、硝酸塩が不良発酵を抑制し、サイレージ品質並びに飼料価値を改善することを明らかにした。また、サイレージの発酵過程における硝酸塩の還元経路を明らかにするとともに、この還元経路はサイレージ発酵の良否と密接な関係を有することを明らかにした。

謝 辞

本研究を取りまとめるに当たり、東北大学名誉教授松本達郎博士には懇切なる御指導と御校閲を賜わった。

また、東北大学教授堀口雅昭博士には懇切な御指導と御校閲を賜わり、同教授林兼六博士には有益な助言と御校閲を賜わった。

本研究の当初から今日まで、酪農学園大学教授檜崎昇氏には絶大な御指導と御協力を賜わった。

また、帯広畜産大学元学長大原久友博士、同教授吉田則人博士、福井県畜産試験場長高野信雄博士、農林水産省草地試験場大山嘉信博士、同萬田富治博士並びに同東北農業試験場箭原信男氏には御指導と御援助を賜わった。

本研究の実施に当たり、東北大学助手千秋達道博士、同秋葉征夫博士並びに坂口英博士には有益な助言と御協力を頂いた。

また、酪農学園大学助教授高橋清志博士、同講師菊地政則氏、北海道立根釧農業試験場和泉康史氏並びに同新得畜産試験場坂東健氏には実験の一部に絶大な御協力を頂いた。

本研究の開始以来、酪農学園大学講師野英二氏、同技師吉田博治氏、同上野光敏氏並びに家畜栄養学研究室の学生諸氏には絶大な御協力を頂いた。

ここに、以上の各位に謹んで感謝の意を表する次第である。

なお、本研究は、昭和 47、50、51、53 及び 55 年度の文部省科学研究費による援助を受けた。

文 献

- 1) 荒木 峻, 1971. ガス分析, 初版 3 刷, 117-119, 共立出版, 東京.
- 2) Archibald, J. G., 1953. J. Dairy Sci., 36: 385-390.
- 3) Archibald, J. G. and J. W. Kuzmeski, 1954. J. Dairy Sci., 37: 1283-1290.
- 4) 安宅一夫・檜崎 昇・吉田則人・和泉康史, 1975. 日草誌, 21 (別-1): 101-102.
- 5) 安宅一夫・檜崎 昇・菊地秀利, 1975. 日草誌, 21 (別-1): 103-104.
- 6) 安宅一夫・檜崎 昇, 1976. 酪農大紀要, 6: 303-319.
- 7) 安宅一夫・檜崎 昇, 1977. 酪農大紀要, 7: 55-62.
- 8) 安宅一夫・檜崎 昇・矢野一男, 1977. 日草誌, 23 (別): 107-108.
- 9) 安宅一夫・檜崎 昇・菊地政則・大原久友, 1978. 日草誌, 24 (別): 165-166.

- 10) 安宅一夫・和泉康史・坂東 健・檜崎 昇, 1978. 酪農大紀要, 7: 337-343.
- 11) 安宅一夫, 1979. 農業技術大系, 畜産編, 飼料作物. 農文協, 東京.
- 12) 安宅一夫・檜崎 昇・吉田則人・朝日敏光, 1979. 酪農大紀要, 8: 61-67.
- 13) 安宅一夫・萬田富治・高野信雄・堀口雅昭・松本達郎, 1980. 日草誌, 26 (別): 303-304.
- 14) 安宅一夫・堀口雅昭・松本達郎, 1981. 日草誌, 27 (別): 173-174.
- 15) 安宅一夫・檜崎 昇・野 英二, 1981. 日草誌, 27: 100-105.
- 16) 安宅一夫, 1981. ルミノロジー研究者のつどい, X: 77-80.
- 17) 安宅一夫・檜崎 昇, 1981. 日草誌, 27: 308-317.
- 18) 安宅一夫・檜崎 昇・山本秀樹・菊地政則・松井幸夫, 1982. 日草誌, 27: 421-427.
- 19) Ataku, K., M. Horiguchi and T. Matsumoto, 1982. Proc. XIV Int.Grassld Congr. (in press).
- 20) 坂東 健・鳶野 保, 1970. 北農試集報, 21: 39-47.
- 21) Barnett, A. J. G. and R. L. Reid, 1961. Reaction in the Rumen. pp. 198-203. Edward Arnold London.
- 22) Barry, T. N., E. Menna, P. R. Webb and J. N. Parle, 1980. J. Sci. Food Agric., 31: 133-146.
- 23) Beck, Th. und F. Gross, 1964. Wirtschaftseigene Futter, 10: 298-312.
- 24) Bonner, J., 1950. Plant Biochemistry. pp. 222-230. Academic Press. New York.
- 25) Bremner, J. M. and D. R. Keeney, 1965. Anal. Chim Acta., 32: 485-495.
- 26) Bremner, J. M. and A. P. Edwards, 1965. Soil Sci. Soc. Proc., 504-507.
- 27) Donaldson, E. and R. A. Edwards, 1977. J. Sci. Food Agric., 28: 798-805.
- 28) Dunlop, R. N., 1972. Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine. pp. 259-322. Academic Press. New York and London.
- 29) Fennessy, P. F. and T. N. Barry, 1973. J. Sci. Food Agric., 24: 634-648.
- 30) Fox, J. B. and S. M. Brown, 1969. J. Br. Grassld Soci., 24: 23-24.
- 31) Fuerst, R. and M. M. Landry, 1967. Develop. Ind. Microbiol., 8: 305-312.
- 32) Gordon, C. H., J. C. Derbyshire, H. G. Wiseman and W. C. Jacobson, 1964. J. Dairy Sci., 47: 987-992.
- 33) Gutmann, I. and A. W. Wahlefeld, 1974. Methods of Enzymatic Analysis. pp. 1464-1468. Academic Press. New York and London.
- 34) Hall, O. G., J. Barth and C. S. Hobbs, 1958. J. Animal Sci., 17: 1206.
- 35) Hansan, S. M. and J. B. Hall, 1975. J. Gen. Microbiol., 87: 120-128.
- 36) 原田 勇, 1967. 酪農大紀要, 3: 1-160.
- 37) 原田 勇, 1977. 牧草の栄養と施肥. 養賢堂, 東京.
- 38) 林 弘明・内田仙二・堀米隆男, 1977. 岡大農報, 50: 65-70.
- 39) Henderson, A. R. and P. McDonald, 1975. J. Sci. Food Agric., 26: 653-667.
- 40) Holtenius, P., 1957. Acta. Agric. Scand. 7: 113-163.
- 41) Hungerford, T. G., 1970. Diseases of Livestock. pp. 929-930. Angus and Robertson. Sydney.
- 42) 井上司朗, 1972. 草地試研報, 1: 52-58.
- 43) 石栗敏機, 1976. 日草誌, 22: 65-69.
- 44) 和泉康史・西埜 進・大橋尚夫・小林道臣, 1971. 北農, 38: 46-52.
- 45) 和泉康史・岡本全弘・大森昭治, 1973. 新得畜試研報, 4: 1-7.
- 46) 和泉康史・大橋尚夫・及川 寛, 1972. 日畜会報.
- 47) 和泉康史, 1975. 日畜会報, 46: 24-28.
- 48) Jones, D. I. H., G. A. P. Griffith and R. T. K. Walter, 1965. J. Agric. Sci., 64: 323-328.

- 49) Jones, D. I. H., 1970. *J. Agric. Sci.*, **75**: 515-521.
- 50) 陰山勝弘・森 治夫・佐藤勝郎, 1973. *日畜会報*, **44**: 465-469.
- 51) 厚生省編, 1959. *食品衛生検査指針 (I)*, 46-48.
- 52) 熊沢喜久雄, 1980. *重窒素利用研究法*, 初版 pp. 17-45. 学会出版センター, 東京.
- 53) Lamanna, C. and M. E. Mallette, 1965. *Basic Bacteriology*. 3rd ed. pp. 844. Wilkins and Wilkins. Baltimore.
- 54) Langston, C. W. and C. Bouma, 1960. *J. Dairy Sci.*, **43**: 1575-1584.
- 55) Mabbitt, L. A. and M. Zielinska, 1956. *J. Appl. Bacteriol.*, **19**: 95-101.
- 56) 牧野憲次・小川キミエ・小林亮英, 1972. *日草誌*, **18** (別): 138-139.
- 57) 榎木茂彦・大山嘉信, 1975. *日畜会報*, **47**: 205-211.
- 58) 正岡淑邦・高野信雄, 1976. *草地試研報*, **8**: 27-32.
- 59) 真島英信, 1973. *生理学*, pp. 264-265. 文光堂, 東京.
- 60) 増子孝義・藁谷信一・佐谷野利幸・淡谷恭蔵, 1979. *日草誌*, **25**: 241-245.
- 61) 増子孝義・藁谷信一・佐谷野利幸・淡谷恭蔵, 1980. *日草誌*, **26**: 74-80.
- 62) 増子孝義・久保田誠・松元昭一・三宅佳孝・淡谷恭蔵, 1980. *日草誌*, **26**: 311-317.
- 63) McCullough, M. E., 1961. *J. Animal Sci.*, **20**: 288-291.
- 64) McCullough, M. E., L. R. Sisk and W. W. G. Smart, 1970. *J. Dairy Sci.*, **53**: 1042-1045.
- 65) McDonald, P. and R. Whittenbury, 1967. *Fodder Conservation Occasional Symposium*. No. 3. 76-84. British Grassland Society.
- 66) McDonald, P. and R. Whittenbury, 1973. *Chemistry and Biochemistry of Herbage*. Vol. 3. pp. 33-58. Academic Press. New York.
- 67) McDonald, P. and R. A. Edwards, 1976. *Proc. Nutr. Soci.*, **35**: 20-211.
- 68) 三秋 尚, 1970. *日畜会報*, **41**: 459-463.
- 69) 三秋 尚, 1971. *飼料作物・草地の研究*, 263-276. 養賢堂, 東京.
- 70) Milham, P. J., A. S. Awaad and J. H. Bull, 1970. *Analyst.*, **95**: 751-757.
- 71) 宮崎 昭, 1965. *日畜会報*, **36**: 177-179.
- 72) 宮崎 昭・石田真彦, 1968. *日畜会報*, **39**: 313-318.
- 73) 宮崎 昭, 1972. 博士論文. 京都大学.
- 74) 宮崎 昭・岡本和夫・津田栄三・川島良治・上坂章次, 1974. *日畜会報*, **45**: 183-188.
- 75) 宮崎 昭, 1977. *日畜会報*, **48**: 53-61.
- 76) 森本 宏, 1971. *動物栄養試験法*. 養賢堂, 東京.
- 77) Morris, M. P. and A. Gonzalez-Mas, 1958. *J. Agric. Food Chem.*, **6**: 456-457.
- 78) 名久井忠・岩崎 薫・早川政市・八幡林芳, 1975. *北農試研報*, **111**: 79-90.
- 79) 名久井忠・岩崎 薫・早川政市・阿部 亮・八幡林芳, 1977. *北農試研報*, **117**: 1-9.
- 80) National Research Council., 1975. *Nutrient Requirement of Sheep*. National Academy of Sciences. Washington, D. C.
- 81) 野 英二, 1977. *酪農大紀要*, **7**: 47-54.
- 82) Noller, C. H. and C. L. Rhyked, 1974. *Forage Fertilization*. pp. 363-393. ASA. CSSA. SSA. Madison.
- 83) 大条方義, 1963. *乳製品製造 I*, pp. 121-123. 朝倉書店, 東京.
- 84) Ohshima, M. and P. McDonald, 1978. *J. Sci. Food Agric.* **29**: 497-505.
- 85) Ohshima, M., K. Oouchi and N. Kukino, 1978. *Tech. Bull. Fac. Agric. Kagawa Univ.*, **30**: 19-24.
- 86) 大山嘉信・小川キミエ, 1966. *日畜会報*, **37**: 336-343.
- 87) 大山嘉信・榎木茂彦, 1967. *日畜会報*, **39**: 61-67.
- 88) 大山嘉信・榎木茂彦, 1967. *日畜会報*, **39**: 133-139.

- 89) 大山嘉信, 柁木茂彦, 1967. 日畜会報, **39**: 168-174.
- 90) Ohyama, Y. and S. Masaki, 1968. Jap. J. Zootech. Sci., **40**: 109-115.
- 91) 大山嘉信・柁木茂彦・滝川明宏, 1970. 日畜会報, **41**: 620-624.
- 92) 大山嘉信, 1971. 日畜会報, **42**: 301-317.
- 93) Ohyama, Y., S. Masaki and T. Morichi, 1973. Jap. J. Zootech. Sci., **44**: 59-67.
- 94) Ohyama, Y. and S. Masaki, 1974. Jap. J. Zootech. Sci., **45**: 419-423.
- 95) 大山嘉信・森地敏樹, 1979. 微生物の生態, **6**: 161-178. 学会出版センター, 東京.
- 96) Paul, J. L. and R. M. Carlson, 1968. J. Agric. Food Chem., **16**: 756-768.
- 97) Peterson, W. H., R. H. Burris, R. Sant and H. N. Little, 1958. J. Agric. Food Chem., **6**: 756-768.
- 98) Payne, W. J., 1973. Bacteriol. Rev., **37**: 409-452.
- 99) Riha, W. E. Jr. and M. Sorberg, 1973. J. Food Sci., **38**: 1-3.
- 100) 佐々木博, 1972. 北大農学部邦文紀要, **8**: 188-251.
- 101) Schaadt, H. and R. R. Johnson, 1968. J. Dairy Sci., **51**: 802-804.
- 102) Smith, H. A. and T. C. Jones, 1957. Veterinary Pathology. pp. 575-576. Lea and Febiger. Philadelphia.
- 103) Smith, D., 1973. Chemistry and Biochemistry of Herbage. Vol. 1. pp. 105-155. Academic Press. London and New York.
- 104) Sprague, M. A. and B. B. Taylor, 1970. Agro. J., **62**: 749-753.
- 105) 須藤 浩, 1956. 日畜会報, **27**: 99-103.
- 106) 須藤 浩, 1971. サイレージと乾草, 第1版. 養賢堂, 東京.
- 107) 須藤 浩・内田仙二・守分俊彦・国眼重雄, 1971. 岡大農報, **38**: 39-49.
- 108) 須藤 浩・内田仙二・長浜知洋, 1972. 岡大農報, **39**: 31-39.
- 109) 高橋正行・山本勝昭・森崎清之・丸山富美子・山本伸明, 1973. 日草誌, **19**: 358-365.
- 110) 高橋正行・山本勝昭・森崎清之・丸山富美子・山本伸明, 1973. 日草誌, **19**: 366-370.
- 111) 高橋正行・鈴木敏彦, 1975. 日草誌, **21**: 149-153.
- 112) 高野信雄・三股正年, 1959. 北農試報告, **52**: 1-83.
- 113) 高野信雄・山下良弘, 1969. 日草誌, **15**: 121-125.
- 114) 高野信雄・山下良弘, 1972. 北農試農事試験調査資料, **130**: 1-7.
- 115) 高野信雄・井上 登・正岡淑邦・萬田富治, 1977. 草地試研報, **11**: 98-105.
- 116) 田口亮平, 1958. 作物生理学, pp. 313-318. 養賢堂, 東京.
- 117) 田宮信雄・八木達彦, 1979. コーン・スタンプ生化学, 第4版, 430-431. 東京化学同人, 東京.
- 118) 梅津頼三郎, 1970. 大分畜試草地部報告, **1**: 1-90.
- 119) 内田仙二・須藤 浩・坂口 英, 1974. 岡大農報, **43**: 47-52.
- 120) 内田仙二, 1978. 岡大農報, **51**: 49-55.
- 121) 内田仙二・内田真人・堀米隆男, 1979. 岡田農報, **54**: 51-57.
- 122) 内田仙二・内田真人・堀米隆男, 1980. 岡大農報, **55**: 1-6.
- 123) Van Soest, P. J., 1963. J. A. O. A. C., **46**: 829-835.
- 124) Van Soest, P. J. and R. H. Wine, 1967. J. A. O. A. C., **50**: 50-55.
- 125) Waldo, D. R., J. E. Keys, L. W. Smith and C. H. Gordon, 1971. J. Dairy Sci., **54**: 77-84.
- 126) Wang, L. C. and R. C. Burris, 1960. J. Agric. Food Chem., **8**: 239-242.
- 127) Watson, S. J. and M. J. Nash, 1960. The Conservation of Grass and Forage Crops. Oliver and Boyd. Edinburgh and London.
- 128) Webster, G. C., 1959. Nitrogen Metabolism in Plants. Row. Peterson. New York.
- 129) Whitehead, D. C., 1970. The Role of Nitrogen in Grassland Productivity. Commonwealth Agricultural Bureaux. Hurley.

- 130) Whittenbury, R., P. McDonald and D. G. Bryan-Jones, 1967. *J. Sci. Food Agric.*, 18: 441-444.
- 131) Wieringa, G. W., 1958. *Neth. J. Agric. Sci.*, 6: 204-210.
- 132) Wieringa, G. W., 1960. *Proc. 8th Int. Grassld Cong.*, 497-502.
- 133) Wieringa, G. W., 1966. *Proc. 10th Int. Grassld Cong.*, 537-540.
- 134) Wright, M. J. and K. L. Davison, 1964. *Advances in Agronomy*. 16: 197-247.
- 135) 吉田 実, 1975. 畜産を中心とする実験計画法. 養賢堂, 東京.
- 136) 好井久雄, 金子安之, 山口和夫, 1974. 食品微生物. 技報堂, 東京.
- 137) Zimmer, E., 1971. *Technological Paper Presented at International Silage Research Conference*. 59-78.

Summary

Forage absorbs nitrate from soil as a source of nitrogen needed for its growth. The absorbed nitrate will be rapidly assimilated into amino acid, and afterward into protein. If this balance of absorption and assimilation is put into disorder, a large amount of nitrate may sometimes be accumulated within the plant tissues. It is well known that intake of nitrate causes nitrate poisoning in ruminants. On the other hand, reports have been made on the decrease of nitrate content in forage when ensiling was employed. However, little is known about how nitrate content decreases in the course of the ensilage process, and also what effect nitrate bears on silage fermentation.

In this study I discuss the role played by nitrate in silage fermentation, and its effect on the quality of silage and on the nutrition of ruminants.

Here are the outline of the results obtained.

I. The effect of nitrogen fertilization on the quality of silage:

1. Different amounts of nitrogen (0, 5, 10 and 15 kg/10 a) were applied over the forage of first cut, composed mainly of timothy, and the relationship between the amount of nitrogen fertilized and silage quality was analyzed by use of orthogonal polynomials. As a result, crude protein content increased and water soluble carbohydrate (WSC) content decreased as the amount of nitrogen increased. The orthogonal polynomials indicate that the quality of silage had deteriorated as the amount of nitrogen increased.

2. Two different amounts of nitrogen were applied over different experimental forage of various species, maturity and moisture content. As a result, moisture, crude protein and nitrate content in each forage increased in proportion to the amount of nitrogen, while WSC content diminished. The quality of silage showed a remarkable improvement as the amount of nitrogen augmented with only one exception out of eight.

3. Different amount of nitrogen (0, 5, 10 and 20 kg/10 a) were applied over orchard-grass for a period of three years. As a result, the moisture, crude protein and nitrate contained in them increased, while WSC content diminished. The quality of silage was favorable during the first year and it made a further improvement in proportion to the amount of nitrogen fertilized. In the second and the third year, the amount of nitrogen fertilized was increased to 5 kg and 10 kg respectively, and this resulted in deterioration

of the silage quality. However, when more nitrogen was applied, the highest quality of silage was obtained. From this, it was confirmed that regardless of the high protein and low WSC content, a good quality silage can constantly be obtained when the NO_3^- -N in dry matter exceeded 0.19%.

It is clear from the above-mentioned results that there are three variations in the effect of nitrogen fertilization on the quality of silage. Namely, the quality of silage;

(1) deteriorates as the amount of nitrogen fertilized increases.

(2) improves as the amount of nitrogen fertilized increases.

(3) undergoes no change.

When considered from view point of ingredients, the crude protein content increases in the case of (1) and (2) proportionally to the supply of nitrogen, while the WSC content decreases. In addition, a considerable amount of nitrate is accumulated in (2) (more than 0.19% NO_3^- -N content in dry matter), though no change was observed in the case of (1). As for (3), the WSC and nitrate content undergo no change, even though the crude protein content increases proportionally to the fertilized nitrogen. Therefore, it can be surmised that the quality of silage improves when the WSC content is high, and *vice versa*.

The above-mentioned results suggest that nitrate makes a contribution to the improvement of silage quality.

II. The effect of nitrate on silage fermentation:

1. The relationship between the chemical composition of forage and the quality of silage was analyzed by using 31 ensiled samples (orchardgrass reaped in various years or seasons and fertilized with different amounts of nitrogen). The nitrate content in the forage was correlated to acetic acid ($r=0.838$), butyric acid ($r=-0.586$), total acid ($r=0.480$), and Flieg's mark ($r=0.485$) with significant results. In addition, when the nitrate content was high (more than 0.2% NO_3^- -N in dry matter), silage of high quality with no production of butyric acid was constantly obtained irrespective of the WSC and crude protein content. Therefore, it was speculated that the nitrate content in forage contributed to the improvement of the silage quality.

2. Forage material with different nitrate content was ensiled and the quality of resultant silage was examined. The forage was either raw or mixed with potassium nitrate (0.15% or 0.3% of total weight of forage). As a result, the potassium nitrate addition produced silage of high quality with low pH, a large amount of lactic acid, no production of butyric acid, and a low proportion of NH_3 -N. Moreover, large nitrate content in forage as a result of the intense nitrogen fertilization also resulted in silage of good quality. From the above, it was concluded that nitrate was conducive to the procurement good silage without butyric acid.

3. The effect of nitrate addition (0, 0.1, 0.2, 0.3 and 0.4%) on the quality of silage was compared to glucose addition (0 and 2%), by use of orchardgrass and alfalfa. When the potassium nitrate added to orchardgrass, and alfalfa exceeded 0.1% and 0.2% (of total weight of forage) respectively, good silage with almost no butyric acid was obtained.

Comparison of the effects of potassium nitrate and glucose addition showed that former performed well with orchardgrass and the latter with alfalfa. The effectiveness of employing potassium nitrate and glucose at the same time was observed with orchardgrass. However, no such effect was observed with alfalfa, because the glucose addition alone produced fairly good silage. Therefore, it was proven that, even in the case of considerably low WSC content in forage, good silage with no butyric acid could be obtained by nitrate adding.

4. The effect of nitrate on the quality of silage was considered in relation to glucose addition and ensilage temperature (20 and 30°C). The silage deteriorated when the temperature was high (30°C) and no glucose was added. However, it was observed, if potassium nitrate was added to the forage, that good silage could still be obtained under these unfavorable conditions.

5. The effect of nitrate and glucose addition as well as temperature on the distribution of isomers of lactic acid was also considered. As a result, total lactic acid, L(+) lactic acid, and D(-) lactic acid tend to be high from the glucose and potassium nitrate addition. However, the ratio between the L(+) lactic acid and D(-) lactic acid underwent no change. Though the L(+) lactic acid was not affected by the temperature, the total lactic acid and D(-) lactic acid content decreased at a temperature of 30°C. As a result of this, the ratio of L(+) lactic acid to total lactic acid was higher at 30°C than 20°C.

6. In order to study the mode of action by which nitrate improves the quality of silage, the ensilage process was examined after adding three different levels of potassium nitrate (0.05, 0.2 and 0.4%) to the forage. The quality of each silage was good. As the added nitrate increased, pH in the silage decreased and formation of ammonia was eliminated. In this study 2, 3-butanediol was detected, although its amount decreased as the potassium nitrate addition increased. The nitrate content showed a rapid decrease one or two days after ensiling, and production of nitric oxide and nitrous oxide were observed. The amount of production augmented proportionally to that of the potassium nitrate added. This indicated that the quality of silage was closely related to the addition of nitrate.

III. The reduction of nitrate during ensilage process:

1. In order to examine the change of nitrate content during ensilage, the nitrate electrode method was employed for the quantitative analysis of nitrate. It was proven that this method was easy to conduct so that experiments could be carried out expeditiously. Also, it was more accurate than the existing method (The Morris's method).

2. The change of nitrate content at the time of ensiling and hay making were compared. In the case of low nitrate content in the forage material, no change of nitrate content was observed in the either processing method. On the other hand, when the nitrate was high, it diminished remarkably when ensiled, and no change was observed in the hay making. Thus, the more nitrate the forage contained, the more nitrate diminished during ensilage process. A significant correlation was observed between the content and

the amount of nitrate which disappeared. Therefore, the ensiling was considered to be a favorable method for utilizing forage with high nitrate content.

3. The relationship between the silage quality as well as the chemical composition of forage, and the change of nitrate content during ensilage was studied. The amount of nitrate content in forage and the pH of silage. On the other hand, a negative partial correlation was observed between the amount of nitrate that disappeared and the WSC content in forage material. As a result of this, it was concluded that good silage with no butyric acid could always be obtained when a decrease in nitrate occurs.

4. The relationship between the silage quality and the alteration of nitrate content during ensilage was examined by ensiling grass sealed at different times, ensilage temperatures, and of different moisture contents. As a result, the nitrate content of silage showed a negative correlation to pH, and the higher the pH became, the less the nitrate content was.

5. The relationship between the alteration of nitrate content and microflora during ensilage was examined. The time and degree of lowering of nitrate content corresponded very well with those of proliferation of aerobic bacteria. Therefore, it was concluded that the decrease of nitrate content during ensilage occur in the course of reduction of nitrate by the aerobic bacteria.

6. In order to investigate the relationship between reduction of nitrate and the silage quality during ensilage, the process of reduction was traced at different time by ensiling grass of different qualities after adding potassium nitrate (labeled ^{15}N) to it. The NO_3^- - ^{15}N content made a rapid decrease after ensiling while the production of NO - ^{15}N was observed. However, NO - ^{15}N became nonexistent after the fourth day. In addition, reduction from NO_3^- - ^{15}N into NH_3 - ^{15}N was observed during ensilage.

The decrease of NO_3^- - ^{15}N , and the production of NO - ^{15}N and NH_3 - ^{15}N was closely related to pH at the early stage of ensilage: i. e., the higher the pH became, the more significantly the nitrate decreased, and the reduction from nitrate into ammonia was accelerated accordingly, while the production of nitric oxide decreased.

7. In order to verify the process by which high nitrate content of forage material produces good silage, the relationship between the reducing process of nitrate and the silage quality was examined by adding three different amounts of potassium nitrate labeled ^{15}N . As the amount of potassium nitrate addition increased, the lowering of pH was accelerated and the production of ammonia was inhibited. As for the NO_3^- - ^{15}N content, it made a rapid decrease after ensiling. However, addition of potassium nitrate slowed down this decrease. In the case of low nitrate content in the material, nitrate was reduced into ammonia through assimilatory reduction. However, when the addition of potassium nitrate became intense, the reduction into ammonia was inhibited and more nitric oxide and nitrous oxide were produced.

From the above, it was confirmed that the reduction process of nitrate during ensilage was closely related to the quality of silage, (i. e., pH). It was also verified that while nitrate in poor quality silage was mostly reduced to ammonia, silage of good quality

produced more nitric oxide and nitrous oxide; although the decrease of nitrate was small. Moreover, the mechanism of producing high quality silage from grass with high nitrate content was considered to have an inhibiting effect on bacteria. This was caused by nitric oxide and nitrous oxide which were produced during the reduction of nitrate.

IV. The effect of nitrate on the feeding value of silage:

1. Forage of different nitrate content was ensiled and fed to sheep in order to investigate its digestibility and rumen contents. The digestibility of silage improved as the amount of nitrogen fertilization increased. As for the rumen contents, the concentration of propionic acid composed of VFA increased and that of butyric acid decreased when ensilage was done with grass of high nitrate content.

2. Digestion trial, and nitrogen and mineral balance trial were conducted on sheep. Before ensiling, the forage material was fertilized with four different amounts of nitrogen (0, 7.5, 15 and 30 kg/10 a) and was mixed with three different amounts of potassium nitrate (0, 0.2 and 0.4%). High nitrate content of forage material as a result of the intense nitrogen fertilization and high potassium nitrate addition, improved the quality of silage substantially. In addition to this, the digestibility of and retention of nitrogen, calcium, and phosphorus were also improved. Furthermore, the nitrate content became nonexistent during ensilage, so that no bad effect was observed on sheep from both clinical and biochemical points of view.

Conclusion:

This study verified that, in silage fermentation, nitrate inhibits malfermentation and improves the silage quality and the feeding value. It was also confirmed that there was a reduction process of nitrate during ensilage, and that there was a close relationship between this reduction process and the results of silage fermentation.